

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS**

Eli Fernando Pimenta

Volume 1

Investigação das condições de crescimento e produção de metabólitos secundários das linhagens de fungos *Penicillium citrinum* e *Penicillium oxalicum*

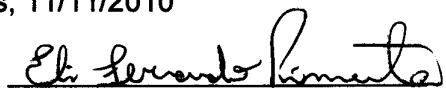
Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos para a obtenção de título de doutor em Ciências. Área de concentração: Físico-Química

Orientação: Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck

São Carlos – SP
2010

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, sob a exclusiva responsabilidade do autor.

São Carlos, 11/11/2010

A handwritten signature in black ink, reading "Eli Fernando Pimenta". The signature is written in a cursive style with a horizontal line underneath the name.

Eli Fernando Pimenta

Dedicatória

*AOS MEUS PAIS
Alzira e Pedro (in memoriam) pelo apoio e amor
dedicados a cada etapa de minha vida.
Sem vocês eu não seria nada.*

Ao meu irmão Adriano pela amizade.

*À minha esposa Juliana pelo apoio,
amor e carinho durante todos estes anos.
Amo você.*

*Aos meus filhos Henrique e Livia,
vocês são a razão de meu viver.*

*“Quando amamos, somos os primeiros beneficiados, porque o amor
cura, alegra, restaura e nos conduz à plena liberdade”.
Obrigado por fazerem parte de minha vida, amo vocês.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck, que nos anos de convivência, muito me ensinou, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual;

À Profa. Dra. Mirna H. R. Seleglim, pela atenção e colaboração ao disponibilizar o laboratório de microbiologia;

À Profa. Dra. Simone P. de Lira e à Dra. Miriam H. Kossuga, pela paciência e ensinamentos durante a realização deste trabalho;

À Darci C. D. Javaroti, pelos ensinamentos e atenção no trabalho com microrganismos;

Ao Prof. Dr. Aristeu G. Tininis (Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia – Sertãozinho – SP) e Prof. Dr. Edenir R. P. Filho (DQ-UFSCar) pela ajuda com as análises multivariadas;

Ao Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira e Dra. Katyuscya Veloso (DQ-UFSCar), e ao Prof. Dr. Raymond J. Andersen (Departments of Chemistry and Earth and Ocean Sciences, University of British Columbia, Vancouver, Canadá) pela obtenção dos espectros de RMN;

À David E. Williams (Departments of Chemistry and Earth and Ocean Sciences, University of British Columbia, Vancouver, Canadá) pela obtenção dos espectros de massas de alta resolução;

Ao Instituto de Química de São Carlos pela infra-estrutura disponibilizada para a realização do curso de doutorado;

À Silvia e Andréia, da seção de pós-graduação, pela educação e ótimo atendimento;

Aos colegas do GQOPN – IQSC: Fábio, Miriam, Raquel, Michelli, Carol, Fabiana, Stela, Juliana, Marcella, Karin, Camila, Angélica, Eliana, Bruna, Érica, Marcos, Isaías, Messias, Karen, Amaro obrigado pela amizade e ajuda durante esses anos;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa;

À Deus por proporcionar muitas alegrias em minha vida.

Volume 1

Sumário

Índice de Figuras.....	iii
Índice de Tabelas.....	vi
Índice de Esquemas.....	viii
Lista de símbolos e abreviaturas.....	ix
Resumo.....	xi
Abstract.....	xii
Capítulo 1 - Introdução.....	1
1.1 Microrganismos - Fungos.....	1
1.2 O interesse histórico no metabolismo secundário dos fungos.....	3
1.3 Microrganismos e os produtos do seu metabolismo secundário.....	5
1.4 Microrganismos marinhos.....	8
1.5 Gênero <i>Penicillium</i>	11
1.5.1 <i>Penicillium oxalicum</i>	13
1.5.2 <i>Penicillium citrinum</i>	15
1.6 Melhoramento das condições de crescimento e produção de metabólitos por microrganismos.....	19
Capítulo 2 Justificativa e objetivos.....	22
Capítulo 3 Materiais e métodos.....	25
3.1 Técnicas e equipamentos utilizados.....	25
3.1.1 Cultivo dos microrganismos.....	25
3.1.2 Técnicas cromatográficas.....	26
3.1.2.1 Extração em fase sólida (EFS).....	26
3.1.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	26
3.1.3 Ressonância magnética nuclear (RMN).....	27
3.1.4 Espectrometria de massas.....	28
3.2 Coleta e isolamento dos microrganismos.....	28
3.3 Caracterização e identificação dos microrganismos.....	29
3.4 Cultivo em pequena escala.....	30
3.5 Planejamento fatorial fracionário.....	30

3.5.1 Efeitos de interação de 1ª ordem	38
3.5.2 Efeitos de interação de 2ª ordem	39
3.5.3 Efeito significativo e gráfico de probabilidades	41
3.5.4 <i>P. oxalicum</i>	44
3.5.5 <i>P. citrinum</i>	44
3.6 Cultivo em média escala	44
3.6.1 <i>P. oxalicum</i>	45
3.6.2 <i>P. citrinum</i>	46
3.7 Isolamento e purificação dos compostos de <i>P. oxalicum</i> e <i>P. citrinum</i>	47
3.7.1 <i>P. oxalicum</i>	47
3.7.2 <i>P. citrinum</i>	47
3.8 Caracterização e identificação dos compostos isolados	48
3.8.1 <i>P. oxalicum</i>	48
3.8.2 <i>P. citrinum</i>	49
Capítulo 4 – Resultados e discussões	51
4.1 Identificação taxonômica das linhagens	51
4.2 Planejamento fatorial fracionário	52
4.2.1 <i>P. oxalicum</i>	52
4.2.2 Isolamento, purificação, caracterização e identificação dos compostos obtidos de <i>P. oxalicum</i>	68
4.2.3 <i>P. citrinum</i>	77
4.2.4 Isolamento, purificação, caracterização e identificação dos compostos obtidos de <i>P. citrinum</i>	94
4.2.4.1 Purificação em CLAE da Fração 3 da EFS – F53OT-3	95
4.2.4.2 Purificação em CLAE da Fração 4 da EFS – F53OT-4	97
4.2.5 Reunião das frações do PFF obtidas para <i>P. citrinum</i> e purificação da Fração 4	122
4.3 Curva da produção de metabólitos secundários por <i>P. citrinum</i>	155
Capítulo 5 – Conclusões	167
Capítulo 6 – Referências bibliográficas	170

Índice de Figuras

Figura 1 – Placas de Petri inoculadas com as linhagens de: A) *P. oxalicum* (F30) e B) *P. citrinum* (F53)29

Figura 2 – Intervalo utilizado para cálculo das áreas dos cromatogramas.....36

Figura 3 – Exemplo de gráfico de probabilidade para os efeitos de 1ª e 2ª ordem, realizado para a Fração 3 da EFS de *P. oxalicum*..43

Figura 4 – Gráfico de probabilidade obtido para as áreas dos cromatogramas da fração 3 da EFS de *P. oxalicum*.57

Figura 5 – Gráfico de probabilidade obtido para as áreas dos cromatogramas da fração 4 da EFS de *P. oxalicum*.58

Figura 6 – Gráfico de probabilidade obtido para a relação área/massa da fração 3 da EFS de *P. oxalicum*.....60

Figura 7 – Gráfico de probabilidade obtido para a relação área/massa da fração 4 da EFS de *P. oxalicum*.....61

Figura 8 – Cromatogramas de frações 3 da EFS de diferentes experimentos de crescimento realizados para *P. oxalicum*.....66

Figura 9 – Cromatograma utilizado para a purificação da fração 3 da EFS a partir do crescimento em 1750 mL de meio de cultura de *P. oxalicum* (F30).....69

Figura 10 – Espectros de absorção na região do UV e de massas obtido para a amostra F30OT-3-P171

Figura 11 – Espectros de absorção na região do UV e de massas obtido para a amostra F30OT-3-P272

Figura 12 – Espectros de absorção na região do UV e de massas obtido para a amostra F30OT-3-P374

Figura 13 – Proposta de fragmentação para a meleagrina.75

Figura 14 – Proposta de fragmentação para a oxalina.....77

Figura 15 – Gráfico de probabilidade obtido para as áreas dos cromatogramas da fração 3 da EFS de *P. citrinum*.....82

Figura 16 – Gráfico de probabilidade obtido para as áreas dos cromatogramas da fração 4 da EFS de *P. citrinum*.....83

Figura 17 – Gráfico de probabilidade obtido para a relação área/massa da fração 3 da EFS de *P. citrinum*85

Figura 18 – Gráfico de probabilidade obtido para a relação área/massa da fração 3 da EFS de <i>P. citrinum</i>	86
Figura 19 – Cromatogramas de frações 3 da EFS de diferentes experimentos de crescimento realizados para <i>P. citrinum</i>	91
Figura 20 – Cromatogramas de frações 4 da EFS de diferentes experimentos de crescimento realizados para <i>P. citrinum</i>	93
Figura 21 – Cromatograma utilizado para a purificação da fração 3 da EFS a partir do crescimento em 2 L de meio de cultura de <i>P. citrinum</i> (F53)	95
Figura 22 – Cromatograma utilizado para a purificação da fração 4 da EFS a partir do crescimento em 2 L de meio de cultura de <i>P. citrinum</i> (F53)	97
Figura 23 – Espectros de absorção na região do UV e de massas referente as frações F53OT-3-P1-1, F53OT-3-P2-1 e F53OT-3-P3-1	102
Figura 24 – Espectros de absorção na região do UV e de massas referente a amostra F53OT-3-P1-4	103
Figura 25 – Espectros de absorção na região do UV e de massas referente a amostra F53OT-3-P2-2	104
Figura 26 – Espectros de absorção na região do UV e de massas referente a amostra F53OT-3-P2-3	105
Figura 27 – Espectros de absorção na região do UV e de massas referente as frações F53OT-3-P2-4 e F53OT-3-P3-2	106
Figura 28 – Espectros de absorção na região do UV e de massas referente a fração F53OT-3-P3-4	107
Figura 29 – Espectro de massas referente a fração F53OT-3-P4-1	107
Figura 30 – Espectros de absorção na região do UV e de massas referente a fração F53OT-3-P5	108
Figura 31 – Espectro de massas referente a fração F53OT-3-P6-2.....	109
Figura 32 – Espectro de massas referente a fração F53OT-3-P6-4.....	110
Figura 33 – Espectro de absorção na região do UV e de massas referente a fração F53OT-3-P7	111
Figura 34 – Espectros de absorção na região do UV e de massas referente as amostras F53OT-3-P8 e F53OT-4-P1	112
Figura 35 – Interconversão dos isômeros rotacionais para 56	114

Figura 36 – Espectros de RMN- ¹ H obtidos para a amostra F53OT-3-P8. Análises realizadas a diferentes temperaturas em equipamento de 400 MHz	115
Figura 37 – Proposta de fragmentação para a amostra F53OT-3-P8 (56)	116
Figura 38 – Espectros de absorção na região do UV e de massas referente as amostras F53OT-3-P9 e F53OT-4-P2.....	117
Figura 39 – Espectros de absorção na região do UV e de massas referente as amostras F53OT-3-P10 e F53OT-4-P3.....	118
Figura 40 – Proposta de possível fragmentação para 57	119
Figura 41 – Espectros de absorção na região do UV e de massas referente as amostras F53OT-3-P11 e F53OT-4-P4.....	120
Figura 42 – Proposta de fragmentação para a amostra F53OT-3-P11 (58).	122
Figura 43 – Cromatograma utilizado para a purificação da fração 4 da EFS obtida a partir da reunião dos experimentos do PFF realizado para <i>P. citrinum</i> (F53)	123
Figura 44 – Espectros de absorção na região do UV e de massas referente a amostra F53-F4-P4	125
Figura 45 – Proposta de fragmentação para a amostra F53-F4-P4 (59).	127
Figura 46 – Cromatograma utilizado para a purificação da amostra F53-F4-P6 obtida a partir da fração 4 da EFS do PFF realizado para a espécie <i>P. citrinum</i>	127
Figura 47 – Espectros de absorção na região do UV e de massas referente a amostra F53-F4-P6-1	128
Figura 48 – Espectros de absorção na região do UV e de massas referente a amostra F53-F4-P6-2	129
Figura 49 – Espectros de absorção na região do UV e de massas referente a amostra F53OT-4-P7	130
Figura 50 – Efeitos NOE observados para o composto F53-F4-P7.....	136
Figura 51 – Cromatograma da fração 4 da EFS contendo picos com perfis químicos semelhantes ao da citrinalina A.....	141
Figura 52 – Gráfico de probabilidade obtido a partir das áreas do pico da citrinalina A com t _R de 19,9 minutos.....	143
Figura 53 – Gráfico de probabilidade obtido a partir das áreas do pico da citrinalina A com t _R de 21,9 minutos.	144

Figura 54 – Cromatograma da fração 2 da EFS contendo picos com perfis químico semelhantes ao da citrinalina A.....	148
Figura 55 – Picos de dois compostos análogos à citrinalina A obtidos em diferentes experimentos de crescimento de <i>P. citrinum</i>	149
Figura 56 – Espectros de absorção na região do UV e de massas referente a amostra F53OTAI-2-P1	151
Figura 57 – Efeitos NOE observados para a citrinalina B.....	153
Figura 58 – Cromatogramas contendo os picos dos metabólitos produzidos pela linhagem de <i>P. citrinum</i>	158
Figura 59 – Espectro de massas e de UV referente ao composto com $t_R = 6,5$ minutos.....	160
Figura 60 – Espectro de massas e de UV referente ao composto com $t_R = 7,8$ minutos.....	161
Figura 61 – Espectro de massas e de UV referente ao composto com $t_R = 11,7$ minutos.....	162
Figura 62 – Curva de produção dos metabólitos secundários a partir da linhagem de <i>P. citrinum</i>	163

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Planejamento fatorial fracionário com ponto central.	32
Tabela 2 – Planejamento fatorial fracionário com ponto central (valores de máximo e mínimo)	33
Tabela 3 – Cálculos realizados para obter os efeitos de 1ª ordem (uma variável) ...	39
Tabela 4 – Cálculos realizados para obter os efeitos de 2ª ordem (duas variáveis).41	
Tabela 5 – Massas (em mg) das frações da EFS obtidas a partir dos experimentos de crescimento do PFF realizados para <i>P. oxalicum</i>	52
Tabela 6 – Áreas dos cromatogramas obtidos a partir dos experimentos de crescimento do PFF de <i>P. oxalicum</i>	54
Tabela 7 – Resultados da relação área do cromatograma / massa da fração obtidas para <i>P. oxalicum</i>	55
Tabela 8 – Efeito das interações de 1ª e 2ª ordem obtidos para as áreas dos cromatogramas das frações da EFS da linhagem de <i>P. oxalicum</i>	56

Tabela 9 – Efeito das interações de 1ª e 2ª ordem obtidos para a relação área/massa das frações de EFS da linhagem de <i>P. oxalicum</i> .	60
Tabela 10 – Condições experimentais obtidas através de análises multivariadas para uma maior produção de metabólitos secundários por <i>P. oxalicum</i> .	63
Tabela 11 – Massas obtidas a partir dos experimentos ótimos realizados para <i>P. oxalicum</i> .	64
Tabela 12 – Áreas dos cromatogramas obtidos a partir dos experimentos ótimos realizados para <i>P. oxalicum</i> .	65
Tabela 13 – Relação área/massa obtidas a partir dos experimentos ótimos realizados para <i>P. oxalicum</i> .	65
Tabela 14 – Massas (em mg) das frações 3 e 4 da EFS obtidas a partir dos experimentos de crescimento do PFF realizados para <i>P. citrinum</i> .	78
Tabela 15 – Áreas dos cromatogramas das frações 3 e 4 da EFS dos experimentos de crescimento do PFF realizados para <i>P. citrinum</i> .	79
Tabela 16 – Relação área do cromatograma/massa da fração dos experimentos de crescimento do PFF realizados para <i>P. citrinum</i> .	80
Tabela 17 – Efeito das interações de 1ª e 2ª ordem para obtidos para as áreas dos cromatogramas das Frações da EFS da linhagem de <i>P. citrinum</i> .	81
Tabela 18 – Efeito das interações de 1ª e 2ª ordem obtidos para a relação área/massa para as Frações da EFS da linhagem de <i>P. citrinum</i> .	85
Tabela 19 – Condições experimentais obtidas a partir de análises multivariadas para a maior produção de metabólitos secundários por <i>P. citrinum</i> .	87
Tabela 20 – Massas obtidas a partir dos experimentos ótimos realizados para <i>P. citrinum</i> .	88
Tabela 21 – Áreas dos cromatogramas obtidos a partir dos experimentos ótimos realizados para <i>P. citrinum</i> .	89
Tabela 22 – Relação área/massa obtidos a partir dos experimentos ótimos realizados para <i>P. citrinum</i> .	90
Tabela 23 – Frações obtidas após purificação por CLAE da fração 3 da EFS obtida a partir do crescimento de 2 L do meio de cultura de <i>P. citrinum</i> .	96
Tabela 24 – Compostos identificados nas separações por CLAE-UV das frações 3 e 4 da EFS obtidas a partir do crescimento de 2 litros de meio de cultura realizado para <i>P. citrinum</i> .	100
Tabela 25 – Amostras que possuem mesmo perfil químico e foram reunidas.	101

Tabela 26 – Dados dos deslocamentos químicos de RMN- ¹ H (400 MHz) e RMN- ¹³ C (100 MHz) obtidos em DMSO- <i>d</i> ₆ para a amostra F53OT-3-P8 comparados com dados da literatura obtidos para o composto 56	114
Tabela 27 – Dados dos deslocamentos químicos de RMN- ¹ H (400 MHz) e RMN- ¹³ C (100 MHz) obtidos em DMSO- <i>d</i> ₆ , para a amostra F53OT-3-P11, comparados com dados da literatura obtidos para o composto 58	121
Tabela 28 – Frações obtidas após purificação por CLAE da fração 4 da EFS obtida a partir da reunião das frações do PFF realizado para <i>P. citrinum</i>	123
Tabela 29 – Dados dos deslocamentos químicos de RMN- ¹ H (400 MHz) e RMN- ¹³ C (100 MHz) obtidos em DMSO- <i>d</i> ₆ , para a amostra F53-F4-P4, comparados com dados da literatura obtidos para o composto 59	126
Tabela 30 – Dados dos deslocamentos químicos de RMN- ¹ H (600 MHz) e RMN- ¹³ C (150 MHz) obtidos em DMSO- <i>d</i> ₆ para a amostra F53-F4-P7	137
Tabela 31 – Dados dos deslocamentos químicos de RMN- ¹ H (600 MHz) obtidos em DMSO- <i>d</i> ₆ para a citrinalina A (60) comparados com os dados obtidos para a ciclopamina B (61).....	139
Tabela 32 – Planejamento Fatorial Fracionário e áreas dos picos com perfil químico semelhante ao da citrinalina A.	142
Tabela 33 – Efeito das interações de 1 ^a e 2 ^a ordem para as áreas do pico com perfil químico semelhante ao da citrinalina A.....	143
Tabela 34 – Massas das frações da EFS e áreas dos picos com perfil químico semelhante ao da citrinalina A obtidas após os experimentos de crescimento realizados em condições otimizadas.....	148
Tabela 35 – Dados dos deslocamentos químicos obtidos para a citrinalina B (62) comparados com os dados obtidos para a citrinalina A (60).....	152

Índice de Esquemas

Esquema 1 – Fluxograma ilustrando a realização do Planejamento Fatorial Fracionário, filtração, extração e análise por CLAE-UV	37
Esquema 2 – Fluxograma ilustrando todo o processo de purificação a partir da produção em média escala (2 L), de meio de cultura, realizada para a espécie de <i>P. citrinum</i>	99
Esquema 3 – Fluxograma da reunião das frações da EFS obtidas a partir do PFF para a espécie de <i>P. citrinum</i>	124
Esquema 4 – Procedimento de filtração e extração dos experimentos F53OTAI-1; F53OTAI-2 e F53-normal.....	147

Esquema 5 – Procedimento de filtração e extração dos experimentos de curva de crescimento realizado para *P. citrinum* 157

Lista de símbolos e abreviaturas

EFS – extração em fase sólida

PFF – planejamento fatorial fracionário

MF – meio fungos marinhos

ITS – Internal transcribed spacer

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

CYA – Czapeck Yeast Agar

MEA – Malt Extract Agar

G25N – 25% Glycerol Nitrate Agar

ExMeOH – extrato metanólico

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

CLAE-UV – cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a ultra-violeta

CLAE-UV-EM – cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetros de ultravioleta e de massas

m/z – razão massa carga do íon

ISE⁺ – ionização por spray de elétrons em modo positivo

SE⁺ – spray de elétrons em modo positivo

u.m.a. – unidade de massa atômica

δ - deslocamento químico

RMN-¹H – ressonância magnética nuclear do hidrogênio

RMN-¹³C – ressonância magnética nuclear do carbono 13

s – singleto

d – dubleto

t – tripleto

qui – quintupleteo

m – múltiplo

nd – não definido

n.o. – não observado

J – constante de acoplamento

COSY – correlation spectroscopy

CLD – correlação à longa distância

HMBC – heteronuclear multiple bond coherence

HSQC – heteronuclear single quantum coherence

NHSQC – ^{15}N - ^1H heteronuclear single quantum coherence

tROESY – transverse rotating-frame overhauser enhancement spectroscopy

NOE – nuclear overhauser effect

Resumo

No presente estudo, duas espécies de fungos isoladas do ambiente marinho tiveram seus extratos brutos ativos contra *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* para uma espécie de *P. citrinum* e, atividade citotóxica e contra *Mycobacterium tuberculosis* para uma espécie de *P. oxalicum*. Estas foram estudadas com a finalidade de otimizar suas condições de crescimento para produção de metabólitos secundários. Foram realizadas análises multivariadas utilizando planejamento fatorial fracionário. Foram obtidas duas condições ótimas de crescimento para as duas linhagens de *Penicillium*. O crescimento em maior volume em condições de cultura otimizadas para *P. oxalicum* permitiu observar a presença de três metabólitos secundários no extrato do meio de cultura. Dois puderam ser isolados e identificados: a meleagrina **52** e a oxalina **26**. A metodologia utilizada para se obter uma maior quantidade de metabólitos secundários proporcionou, ainda, o incremento em cerca de 150% na área do pico da oxalina. A partir do crescimento em maior volume em condições de cultura otimizadas para *P. citrinum* foi possível observar presença de pelo menos onze diferentes metabólitos na análise dos extratos obtidos do meio de cultura. Foi possível identificar e isolar quatro compostos já conhecidos: a (8*E*)-1-(2,3-diidropirrol-1-il)-2-metildec-8-eno-1,3-diona **56**; a 1-(2,3-diidropirrol-1-il)-2-metildecano-1,3-diona **58**; a 2-((*E*)-hept-5-enil)-6,7,8,8a-tetraidro-3-metilpirrolo[2,1-*b*][1,3]oxazin-4-ona **59** e a citrinina **31**. Também foram isolados dois novos alcalóides indólicos contendo um grupo nitro na molécula que foram nomeadas de citrinalinas A **60** e B **62**. Foi realizado, também, um estudo com *P. citrinum* visando a maior produção das citrinalinas, que possibilitou o incremento na produção da citrinalina B.

Abstract

In this study, two species of fungi isolated from the marine environment had their active extracts against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* to a strain of *P. citrinum*, and activity cytotoxic and against *Mycobacterium tuberculosis* to a strain of *P. oxalicum*. This studied aims the optimization their growth conditions for the production of secondary metabolites. Multivariate analysis using a fractional factorial design were used to establish optimal growth conditions for both *Penicillium* strains. Two optimal growth conditions were obtained for both *Penicillium* strains. A largest growth volume of *P. oxalicum* using optimized conditions enabled the detection of three secondary metabolites in the culture media crude extract. Two of such compounds were isolated and identified: meleagrins **52** and oxaline **26**. The methodology used to increase the production of secondary metabolites by *P. citrinum* enabled an increase of 150% in the peak area of oxaline. A largest growth volume of *P. citrinum* led to the detection of eleven different metabolites in the culture media. Four of these compounds were isolated and identified as the known (8*E*)-1-(2,3-dihydropyrrol-1-yl)-2-methyldec-8-ene-1,3-dione **56**; the 1-(2,3-dihydropyrrol-1-yl)-2-methyldecane-1,3-dione **58**; the 2-((*E*)-hept-5-enyl)-6,7,8,8a-tetrahydro-3-methylpyrrolo[2,1-*b*][1,3]oxazin-4-one **59** and citrinin **31**. Two new indole alkaloids containing a nitro group were also isolated and identified, named citrinalins A **60** and B **62**. A further study with *P. citrinum* aiming an enhanced production of citrinalins allowed a significant increase in the production of citrinalin B.

Capítulo 1

Introdução

Capítulo 1 – Introdução

1.1 Microrganismos – Fungos

Os fungos são organismos eucariotos pertencentes ao Reino Fungi (Domínio Eucarya) e possuem características particulares que os distinguem dos organismos procariotos, tais como o maior tamanho das células e a presença de núcleo, vacúolo e mitocôndria (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 1996). Estes organismos possuem paredes celulares constituídas por quitina (exceto alguns fungos aquáticos); não realizam fotossíntese; alimentam-se por absorção de nutrientes previamente digeridos por enzimas extracelulares; se reproduzem por esporos sexuada ou assexuadamente. Suas células podem apresentar um só núcleo ou serem multinucleadas, possuem vida independente e não se reúnem para formar tecidos verdadeiros.

Os fungos são considerados onipresentes na maioria dos ambientes com vida e podem utilizar substâncias simples para o crescimento (PEI-CHIH; HUEY-JEN; CHIA-YIN, 2000). Estes organismos possuem uma notável habilidade para utilizar quase todas as fontes de carbono como fonte de energia para o seu desenvolvimento (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996). Podem ainda tolerar condições ambientais extremas, como a baixa disponibilidade de água e alta pressão osmótica, como no caso dos halofílicos, os quais se desenvolvem em ambiente com elevada concentração de sais.

Vários fungos podem se desenvolver em meios com baixo teor de nutrientes, contendo amônia ou nitritos, carboidratos simples e sais minerais. Os oligoelementos mais requeridos para o desenvolvimento destes organismos são ferro, zinco, manganês, cobre, molibdênio e cálcio. Alguns fungos necessitam

fatores de crescimento que não conseguem sintetizar. A temperatura para seu crescimento abrange uma ampla faixa, havendo espécies psicrofílas, mesófilas e termófilas. A maioria dos fungos tolera amplas variações de pH, incluindo os fungos filamentosos que podem crescer na faixa de pH entre 1,5 e 11. O crescimento destes microrganismos leva, em média, de 7 a 15 dias de incubação. A necessidade de exposição à radiação luminosa varia de acordo com a espécie: muitas exigem luz para seu desenvolvimento; outras são inibidas pela luz.

Dois tipos diferenciados de colônias podem se desenvolver em meios de cultivo especiais: leveduriformes e filamentosas. As colônias leveduriformes são unicelulares, enquanto que as colônias filamentosas são constituídas por estruturas multicelulares em forma de tubo denominadas de hifas. Ao conjunto de hifas dá-se o nome de micélio. O micélio do interior do substrato, que funciona como elemento de sustentação e de absorção de nutrientes, é chamado de micélio vegetativo. O micélio da superfície e que cresce acima do meio de cultivo é o micélio aéreo. Por ocasião da reprodução o micélio aéreo se diferencia para sustentar os corpos de frutificação ou propágulos. Os fungos apresentam diferentes formas de reprodução, segundo o grupo a que pertencem, sendo esta uma característica determinante na sua classificação.

Atualmente, considera-se que o número total de espécies de fungos descritas seja de 72.000. Todavia, pelo fato de não existir um catálogo mundial das espécies de fungos já descritas, estima-se que tal número possa alcançar 150.000, o que corresponderia a aproximadamente 10% de um número estimado de espécies de fungos, cerca de 1.500.000 (COLWELL, 1997; BULL; WARD; GOODFELLOW, 2000).

Com base no mecanismo do seu sistema reprodutivo, os fungos podem ser agrupados do seguinte modo: a) **Phycomycetae** (ou fungos inferiores, também chamados de Zygomycotas) que tem talo simples, esporos e hifas unicelulares septadas; b) **Ascomycetae** é um grupo superior que possui hifas septadas e os esporos são suportados por uma estrutura conhecida como asco, um exemplo deste grupo são os *Aspergillus* e *Penicillium*; c) **Basidiomycetae** é um grupo superior em que os esporos são suportados por corpos de frutificação, a parte comestível do cogumelo comum, *Agaricus bisporus*, é um exemplo; d) **Deuteromycetae** é um grupo em que a reprodução é rara e desconhecida, um exemplo são os fungos conhecidos como *Fusarium* (HANSON, 2008).

1.2 O interesse histórico no metabolismo secundário dos Fungos

O metabolismo secundário dos fungos apresenta grande interesse, e estes organismos começaram a ser estudados a séculos atrás. Devido ao ambiente competitivo em que vivem, muitos fungos podem produzir antibióticos para competir por nutrientes e espaço. O médico grego Dioscórides descreveu o uso de uma infusão chamada de Agaricium, obtida a partir da espécie *Fomitopsis (Polyporus) officinalis*, utilizada para o tratamento da tuberculose. Esta atividade foi atribuída à presença do ácido α -cetilcítrico (1). O “homem de gelo”, cujo corpo de 5300 anos de idade foi encontrado nos Alpes entre a Itália e Áustria, possuía consigo uma espécie de *Pitoporus betulinus*. Este fungo é ativo contra infecções de feridas causadas por bactérias como *Staphylococcus aureus*. Há também muitos registros do uso de outras espécies de fungos, tal como *Ganoderma lucidum*, utilizados na medicina chinesa antiga contra infecções (HANSON, 2008).

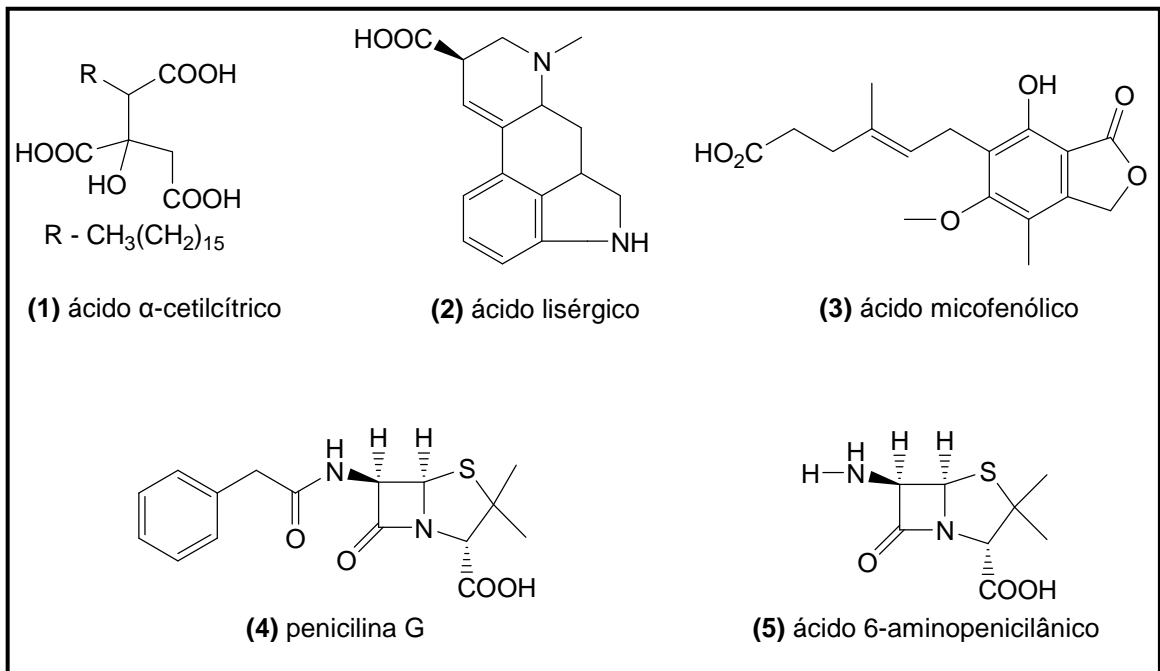
A espécie de fungo *Penicillium glaucum* foi utilizada por Pasteur em 1860 para degradar um enantiômero do ácido tartárico que serviu como base para o estudo da quiralidade. Pasteur também foi um dos primeiros a reconhecer o antagonismo entre os microrganismos, o que levou à criação do termo “antibio” pelo biólogo francês Vuillemin para descrever a atividade das substâncias envolvidas neste processo. O termo “antibiótico” foi redefinido muito mais tarde por Waksman, em 1941, para descrever um produto natural produzido por um microrganismo que inibiu o crescimento de outro microrganismo (HANSON, 2008).

Em 1866 Wenzell isolou uma fração impura de alcalóides. No entanto, as estruturas destes compostos não puderam ser elucidadas. Em 1912 Freeborn isolou a ergoflavina e em 1931 Barger e Bergmann isolaram a ergocristina. Somente em 1935 Craig, Jacobs, Smith e Timons concretizaram o trabalho iniciado por Wenzell com o isolamento de derivados do ácido lisérgico (2).

O ácido micofenólico (3), que é utilizado como imunossupressor, foi isolado pela primeira vez por Gosic de espécies de *Penicillium* em 1896. Posteriormente, este ácido foi isolado de *P. stoloniferum* por Alsberg e Black em 1913 e de *P. brevicompactum* em 1932 por Raistrick, no entanto sua estrutura só foi definitivamente estabelecida em 1952. Durante a primeira guerra mundial foi desenvolvida a fermentação bacteriana da espécie de *Clostridium acetobutylicum*, utilizada para a produção de acetona e butanol, levando ao desenvolvimento da química microbiológica (HANSON, 2008).

A descoberta da penicilina por Fleming, em 1928, revolucionou a química medicinal. Originalmente o fungo foi identificado por Fleming como *Penicillium rubrum*, mas foi posteriormente identificado por Raistrick e Thom como *Penicillium notatum*. Esta descoberta foi um importante marco na procura por compostos

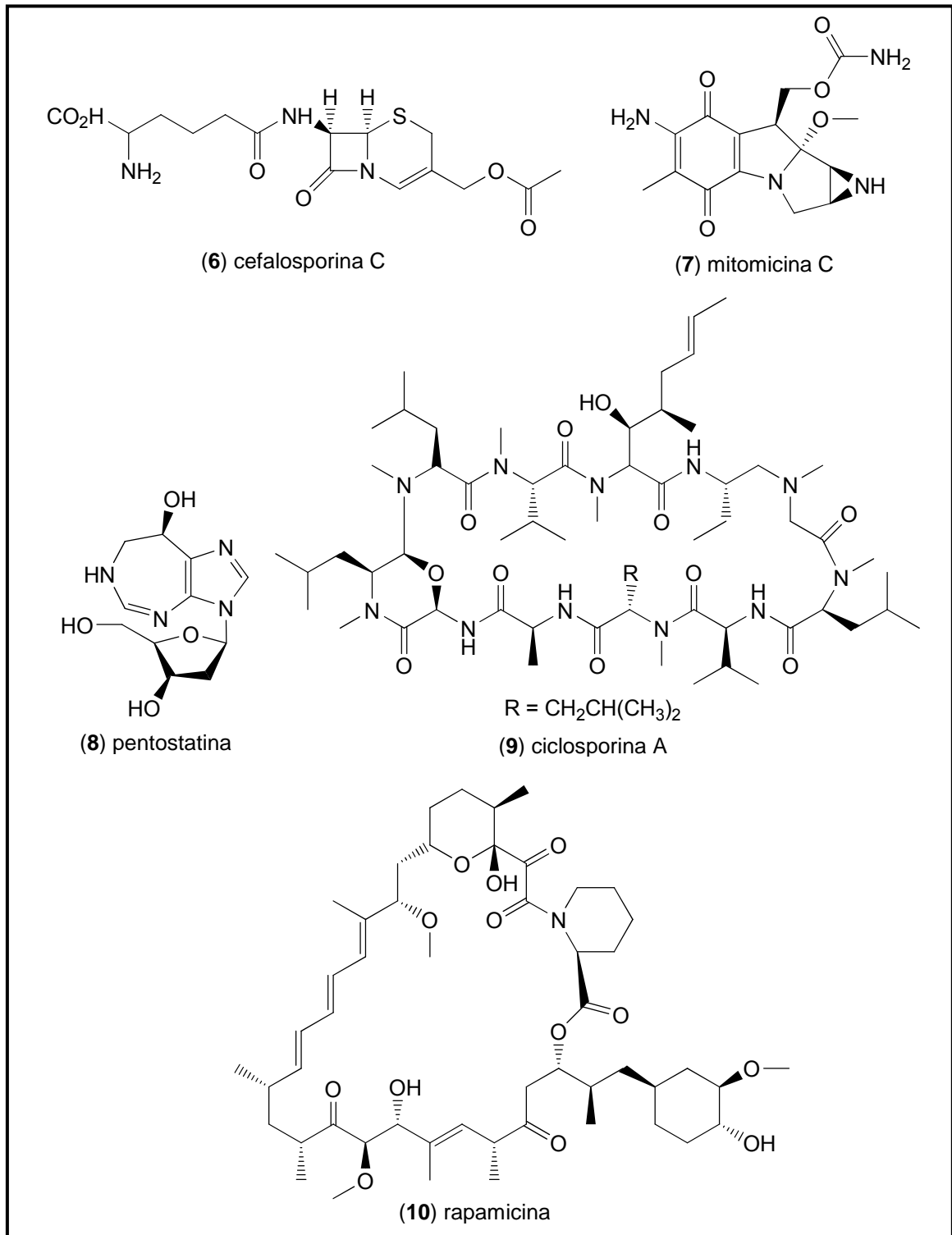
bioativos em microrganismos. Na época Fleming convidou Raistrick para ajudar a isolar o metabólito, mas a instabilidade da penicilina dificultou o seu isolamento. O isolamento e determinação estrutural foram retomados por Florey, Chain, Abraham e Heatley em 1938 em Oxford. Somente em 1945 a estrutura da penicilina G (4) foi estabelecida através de estudos de difração de raios-X, por Dorothy Hodgkin. O esqueleto principal da estrutura das penicilinas, o ácido 6-aminopenicilânico (5), foi isolado em 1959, abrindo caminho para a preparação de penicilinas sintéticas com atividade biológica mais eficiente (HANSON, 2008).



1.3 Microrganismos e os produtos do seu metabolismo secundário

Ao longo dos últimos 40 anos muitos novos metabólitos de fungos foram isolados. Duas grandes áreas de pesquisa contribuíram para o desenvolvimento da química microbiológica: uma delas foi a da pesquisa de fungos responsáveis por causar doenças em plantas (os fitopatogênicos). A outra grande área foi a busca por metabólitos fúngicos de interesse farmacológico (HANSON, 2008).

Compostos de importância farmacológica, como os antibióticos penicilina G (4) e cefalosporina C (6); os antitumorais mitomicina C (7) e pentostatina (8) e os imunossuppressores ciclosporina A (9) e rapamicina (10), são alguns exemplos de metabólitos secundários isolados de fungos (PUPO et al., 2006).



Os fungos do solo apresentam um metabolismo secundário extremamente diversificado. Desde a segunda guerra mundial este grupo de organismos têm sido estudado e explorado quanto à capacidade de produção de substâncias antibióticas. Entre outros, as penicilinas constituem substâncias de enorme importância terapêutica para o tratamento de infecções por microorganismos patogênicos, como, por exemplo, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Enteromorpha* sp. e *Escherichia coli* (SINGH, 2004 parte I; 2004 parte II).

Os microrganismos endofíticos (endo = dentro; fito = planta) são considerados excelentes fontes de metabólitos secundários bioativos, pois estes podem ser facilmente isolados de um nicho biológico que pode conter milhões de espécies em um mesmo ambiente (PUPO et al., 2006).

Atualmente conhece-se mais de 20.000 metabólitos secundários isolados de microrganismos, mas apenas um pequeno percentual desse número chegou à comercialização na forma de medicamento. Um microorganismo é capaz de produzir metabólitos secundários para se adaptar e competir com outros microrganismos presentes em um mesmo ambiente. A condição ambiental é um elemento chave para a descoberta e produção de metabólitos secundários. A quantidade de carbono, nitrogênio e elementos traços (ferro, manganês, zinco), bem como a temperatura, tempo de crescimento e pH do meio de cultura, são fundamentais para a produção de novos metabólitos secundários. Por exemplo, a mudança de um meio de cultura por outro diferente pode aumentar ou iniciar o processo de biossíntese de metabólitos secundários. Para explorar o potencial dos microrganismos, as condições fisiológicas de crescimento utilizadas para gerar extratos precisam ser diversificadas (KNIGHT et al., 2003).

Diversos tipos de meios de cultura têm sido utilizados para o cultivo de microrganismos, e uma pequena alteração nos seus componentes, bem como temperatura e tempo de crescimento, pode alterar seu metabolismo secundário.

1.4 Microrganismos marinhos

Ao contrário da química de produtos naturais de macrorganismos marinhos (macroalgas, invertebrados e vertebrados), que cresceu rapidamente a partir dos anos 70, a química de produtos naturais de microrganismos marinhos vem se desenvolvendo de maneira crescente somente a partir da década de 90, (KELECOM, 2002).

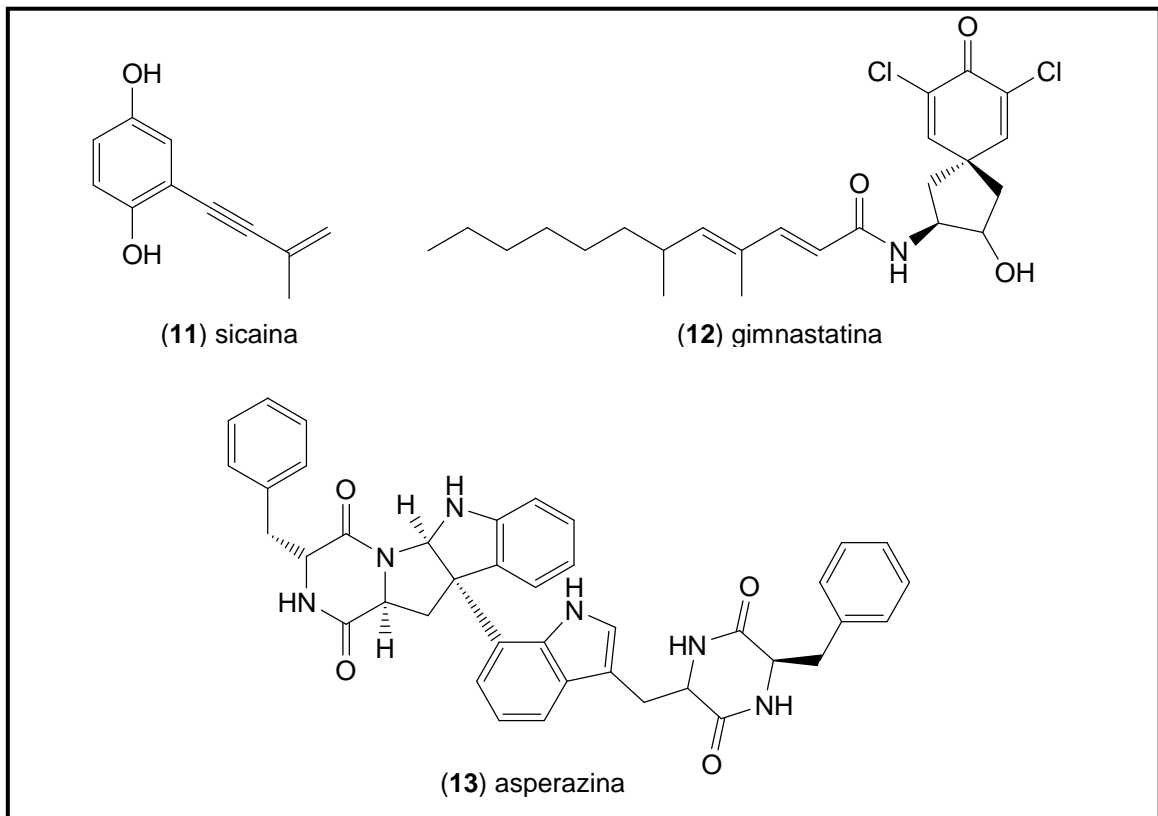
Os fungos marinhos não devem ser classificados apenas por parâmetros fisiológicos. Em 1997 FAULKNER descreve fungos e bactérias marinhas como “aqueles que são isolados de sedimentos e organismos presentes na água do mar”. Em 1979 KOHLMAYER e KOHLMAYER propuseram uma definição mais adequada:

- Fungos marinhos obrigatórios – crescem e esporulam exclusivamente em ambiente marinho ou estuário.
- Fungos marinhos facultativos – são de água doce ou terrestre, mas capazes de crescerem e, possivelmente, esporularem em ambiente terrestre.

O primeiro relato que descreveu um novo metabólito isolado de um fungo do ambiente marinho foi publicado em 1981. O fungo foi identificado como *Halocyphina villosa*, e a sicaina (**11**), que possui atividade antibiótica, foi isolada desta espécie (KUPKA et al., 1981).

A partir de então a descoberta de novos compostos isolados de microrganismos marinhos tem resultado, em grande parte, em compostos com atividades antitumorais (como as gimnastatinas (**12**)) e antimicrobianas. No entanto

outras atividades foram descritas para produtos naturais isolados de fungos do ambiente marinho, como antiviral e antiinflamatória (NUMATA et al., 1997). A asperazina (**13**) isolada do fungo *Aspergillus niger* (obtido da esponja *Hyrtios proteus*) mostrou seletividade citotóxica contra células de leucemia (VAROGLU; CREWS, 2000).



Na primeira revisão sobre produtos naturais de fungos do ambiente marinho, BUGNI e IRELAND (2004) listam 273 compostos isolados até 2002, de fungos marinhos obrigatórios ou facultativos, e discutem as estratégias para o isolamento, o crescimento e a produção de metabólitos secundários por parte destes fungos, enfatizando que a produção dos metabólitos é altamente variável em função das condições de crescimento, especialmente a salinidade do meio de cultura. Os autores observaram também que nem sempre a utilização de meio salino é

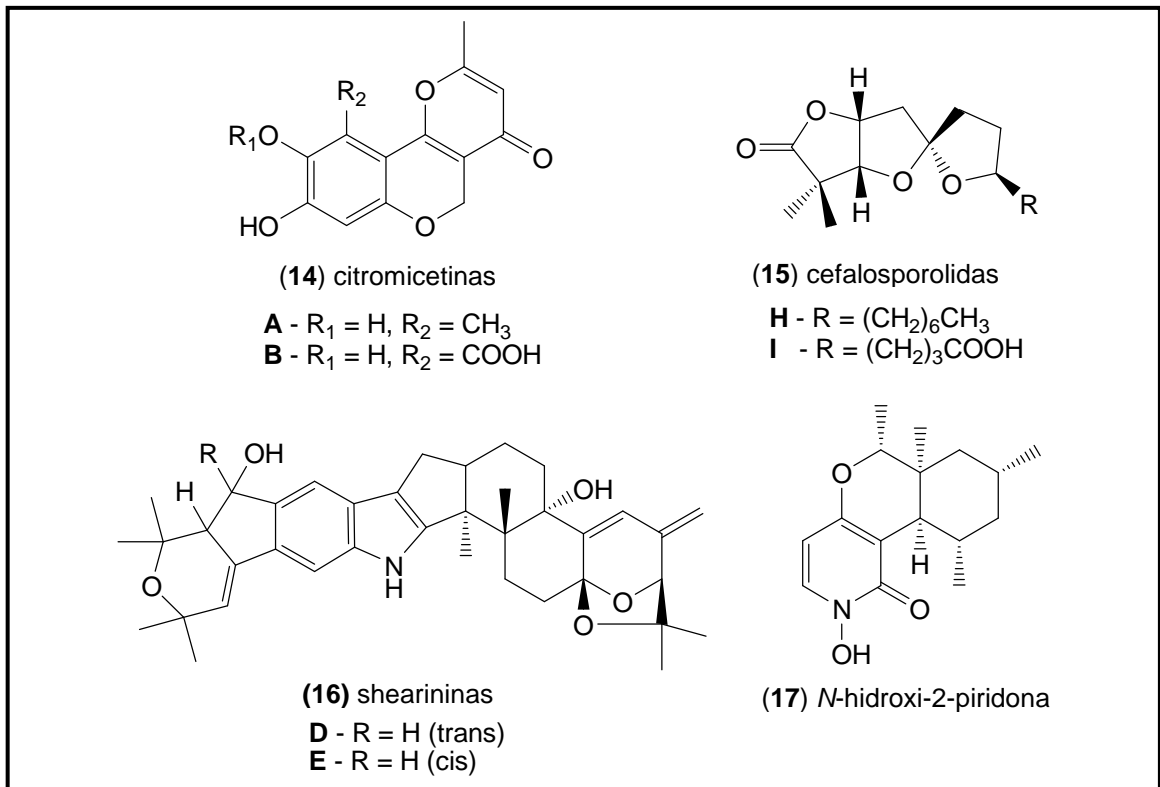
necessária para a produção de metabólitos secundários por parte de fungos isolados do ambiente marinho. (BUGNI; IRELAND, 2004).

Na segunda revisão sobre este assunto, Saleem e colaboradores (2007), citam que entre os anos de 2000 a 2005 foram isolados 103 compostos de microrganismos do ambiente marinho. Os autores dividiram os metabólitos de acordo com suas classes químicas e concluíram que aproximadamente 50 compostos são policetídeos, 10 terpenóides, 20 alcalóides, 14 peptídeos, 2 análogos de cerebrosídeos e 7 metabólitos de biossíntese mista. Os autores também ressaltam que mais de 15 metabólitos de microrganismos do ambiente marinho estão em fase de testes clínicos em seres humanos. Esta revisão demonstra que os fungos marinhos possuem um metabolismo altamente diversificado com compostos biologicamente ativos (SALEEM et al., 2007).

Em revisão de 2009, Blunt e colaboradores citam que do ano de 2006 para 2007 houve um aumento de 38% no número de compostos isolados de microrganismos do ambiente marinho. Nos anos de 2007 e 2008 foram relatados, respectivamente, 208 e 231 novos compostos isolados de microrganismos derivados do ambiente marinho. Segundo os autores, este aumento no número de publicações vem ocorrendo nos últimos anos, devido ao grande interesse por fungos e bactérias do ambiente marinho (BLUNT et al., 2009, 2010).

Alguns exemplos de novos compostos isolados de microrganismos do ambiente marinho são: os policetídeos aromáticos citromicetinas (**14**) isoladas de uma espécie de *Penicillium* sp. (CAPON et al., 2007); as lactonas cefalosporolidas (**15**) isoladas de uma espécie de *Penicillium* sp. (LI et al., 2007); o alcalóide indólico shearinina (**16**) isolado de uma espécie de *Penicillium* (SMETANINA et al., 2007) e o

alcalóide *N*-hidroxi-2-piridona (17) isolado de uma espécie de *Penicillium janthinellum* (DILIP de SILVA et al., 2009).



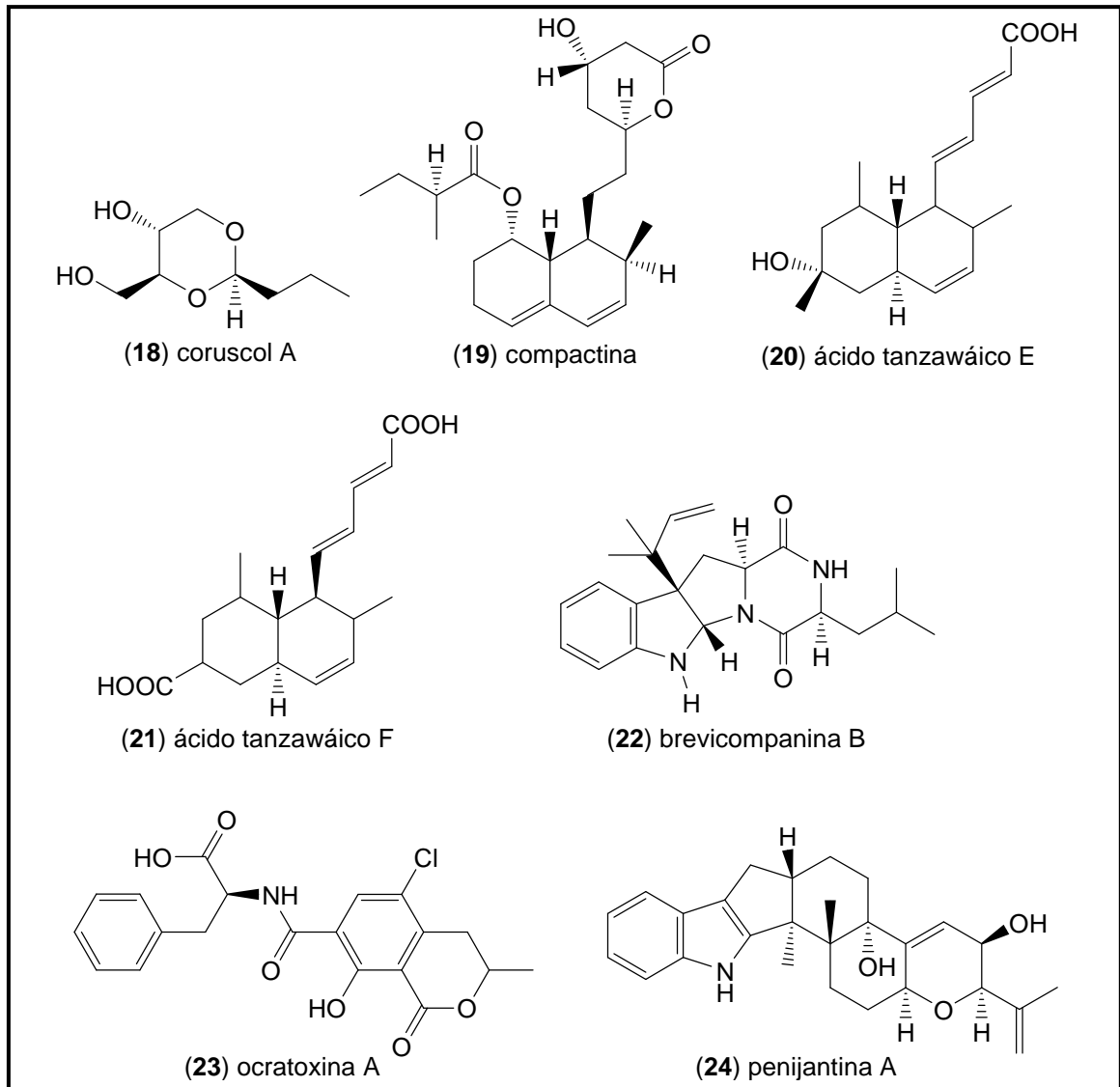
1.5 Gênero *Penicillium*

Os fungos do gênero *Penicillium* pertencem à família dos Trochocomaceae que pertencem à ordem dos Eurotiales, que por sua vez pertencem a classe dos Eurotiomycetos pertencentes ao filo Ascomycota dentro do reino Fungi. Os fungos pertencentes a este gênero são filamentosos e de crescimento rápido. São, na grande maioria, de ambientes terrestres, mas podem ser encontrados, também, em ambientes aquáticos. Estes fungos são amplamente estudados em vários ramos da ciência tendo ênfase na área toxicológica, alimentícia e farmacêutica. Esta última é de grande importância para a área de produtos naturais. A seguir são apresentados

alguns exemplos que citam diversas classes de metabólitos isolados de algumas espécies de fungo pertencentes ao gênero *Penicillium*.

Em 2000, o metabólito coruscol A (**18**) foi isolado de uma espécie de *Penicillium* sp. do molusco *Mytilus coruscus* (KAGATA et al., 2000). A compactina (**19**) foi isolada em 1976 da espécie *P. brevicompactum* (BROWN et al., 1976). A compactina é um potente inibidor na biossíntese do colesterol, e também um agente antifúngico (ENDO; KURODA; TANZAWA, 1976). Podemos citar, ainda, os ácidos tanzawáicos E (**20**) e F (**21**) isolados de uma espécie de *P. steckii* (MALMSTROM; CHRISTOPHERSEN; FRISVAD, 2000).

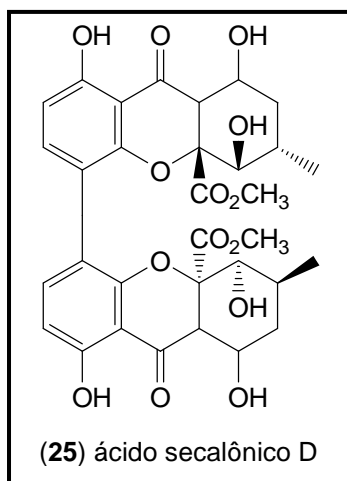
Também são relatados vários alcalóides isolados de diversas espécies de fungos pertencentes ao gênero *Penicillium*, tais como as brevicompaninas (**22**) isoladas de *P. brevicompactum*, que são ativas contra o parasita *Plasmodium falciparum* causador da malária (DU et al., 2009). Alguns alcalóides são altamente tóxicos, como a ocratoxina (**23**), que é mutagênica e carcinogênica, utilizada como marcador quimiotaxonômico para as espécies de *P. verrucosum* e *P. nordicum* (ZHELIFONOVA et al., 2009). A penijantina A (**24**) é um diterpeno indólico isolado da espécie de *P. janthinellum* (ITABASHI et al., 2009).



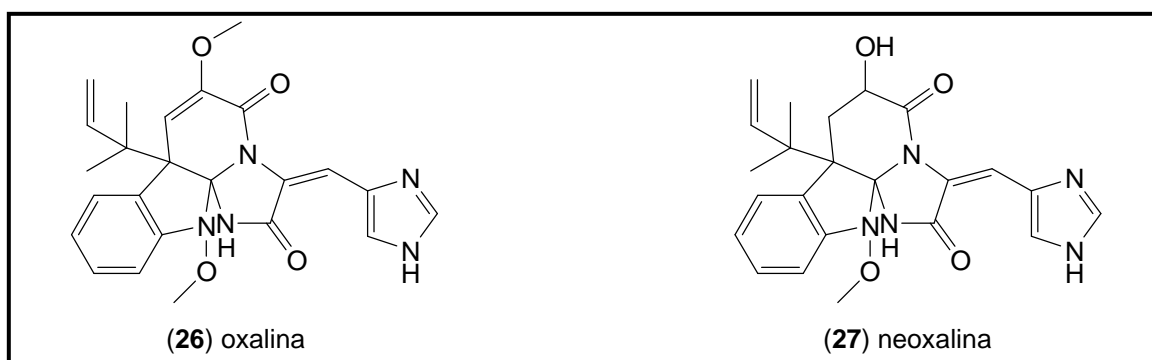
1.5.1 *Penicillium oxalicum*

Em 1915 James N. Currie e Charles Thom observaram a produção de ácido oxálico em 20 linhagens de *Penicillium*. Dentre estas, uma linhagem, não descrita até então, produzia ácido oxálico em grandes quantidades. Esta foi então denominada de *Penicillium oxalicum* (CURRIE; THOM, 1915).

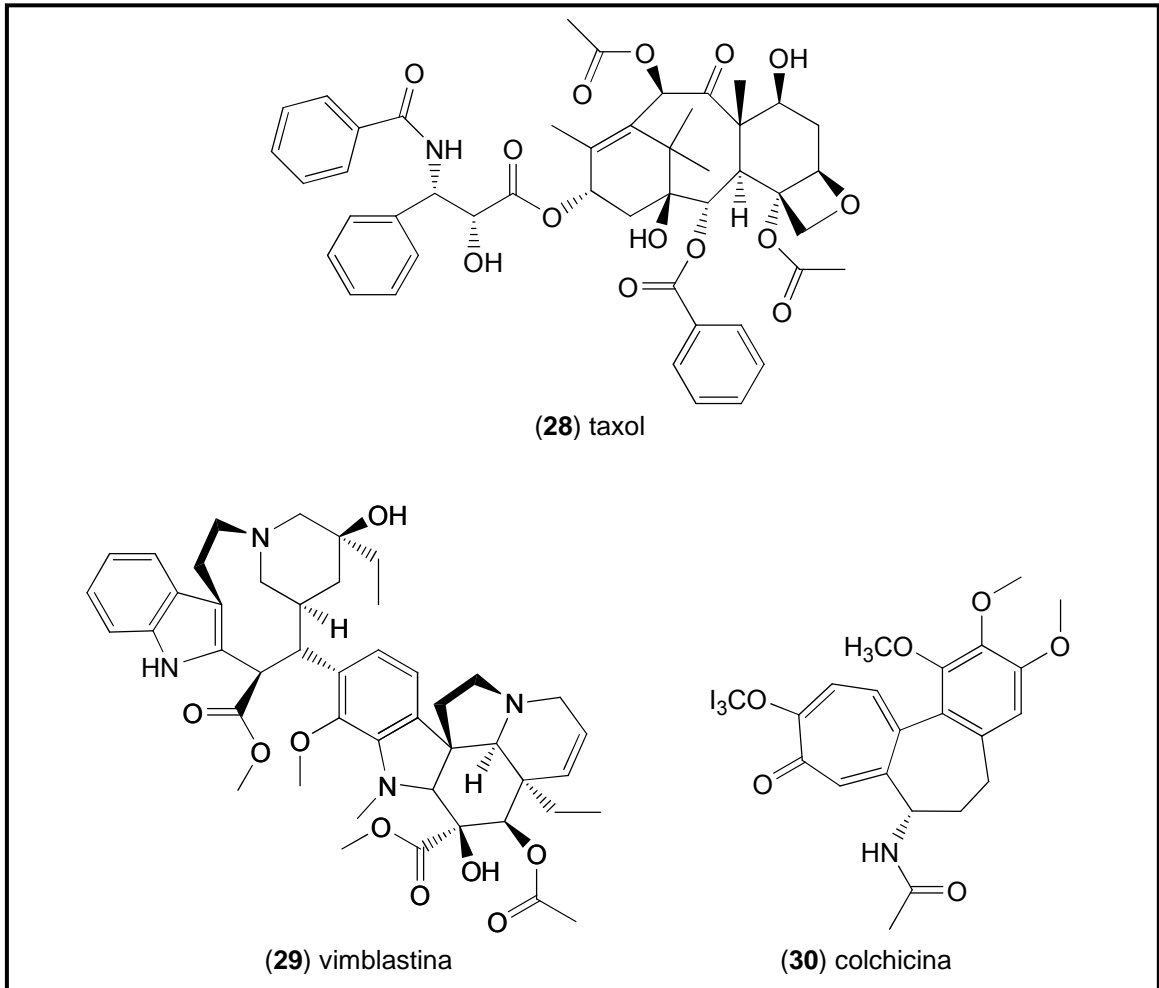
Poucos compostos foram isolados de espécies de *P. oxalicum*, entre os quais o ácido secalônico D (25), bastante estudado devido sua alta toxicidade (STEYN, 1969; CIEGLER; HAYES; VESONDER, 1980).



No ano de 1974 Nagel e colaboradores isolaram um novo alcalóide de *P. oxalicum*, denominado oxalina (26) (NAGEL et al., 1974). Na época não foi identificada atividade biológica deste composto (KONDA et al., 1980). Em 1979 foi isolada da espécie de fungo *Aspergillus japonicus*, por Hirano e colaboradores, um análogo da oxalina, a neoxalina (27), a qual apresentou moderada atividade como estimulante do sistema nervoso central (HIRANO et al., 1979).



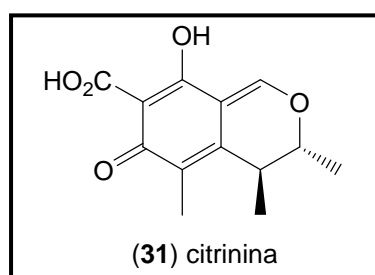
Em 2004 Koizumi, e colaboradores relataram a atividade citotóxica da oxalina e neoxalina (KOIZUMI et al., 2004). Os dois compostos controlam o ciclo da célula na fase M inibindo a polimerização da tubulina, inibição similar à do taxol (28), vimblastina (29) e colchicina (30) (CORREIA, 1991; IWASAKI, 1993) que são fármacos que vem sendo usados em tratamento contra o câncer.



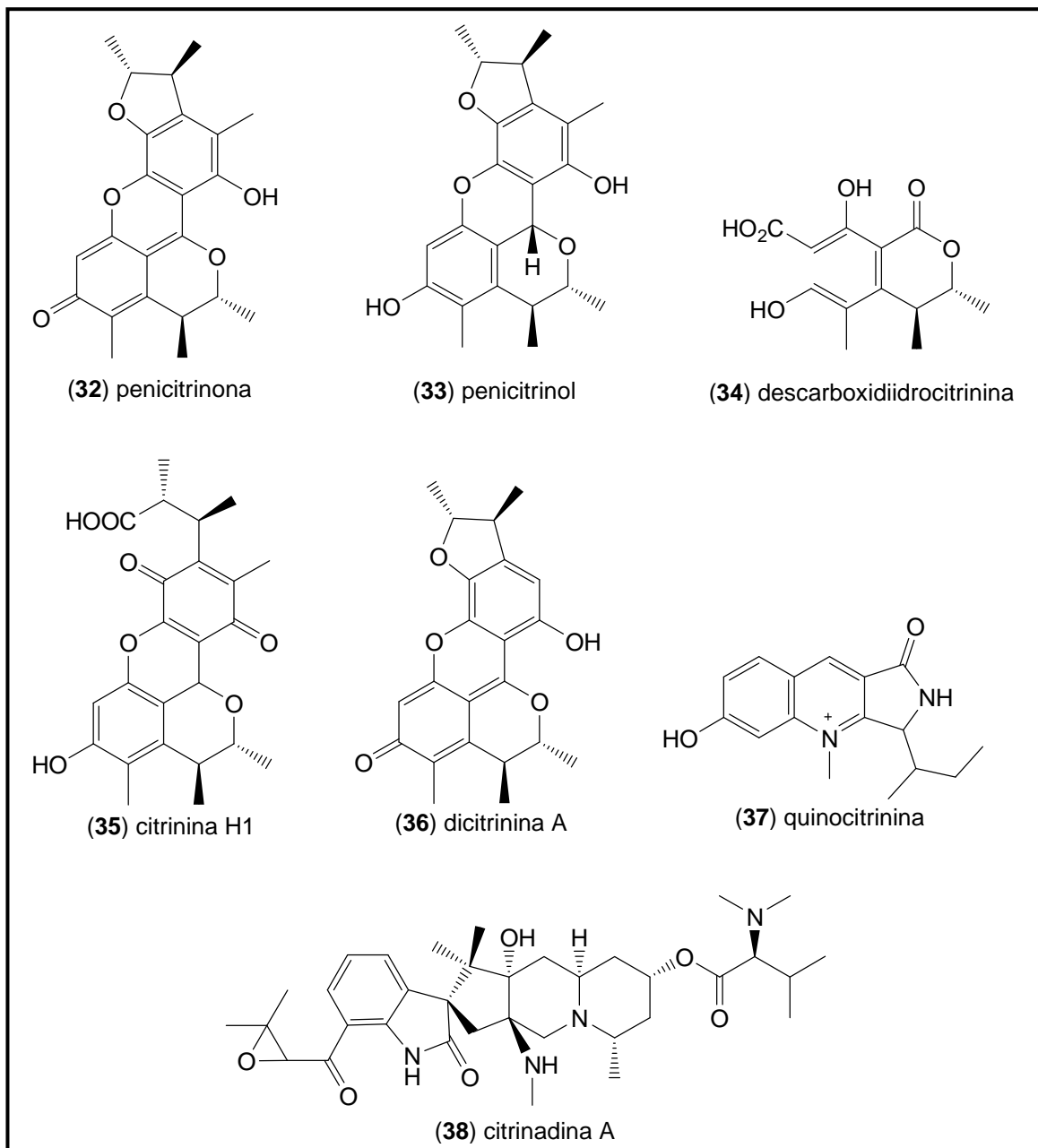
Os estudos realizados com espécies de *P. oxalicum* estão mais concentrados no isolamento de enzimas, na agricultura e na contaminação de alimentos.

1.5.2 *Penicillium citrinum*

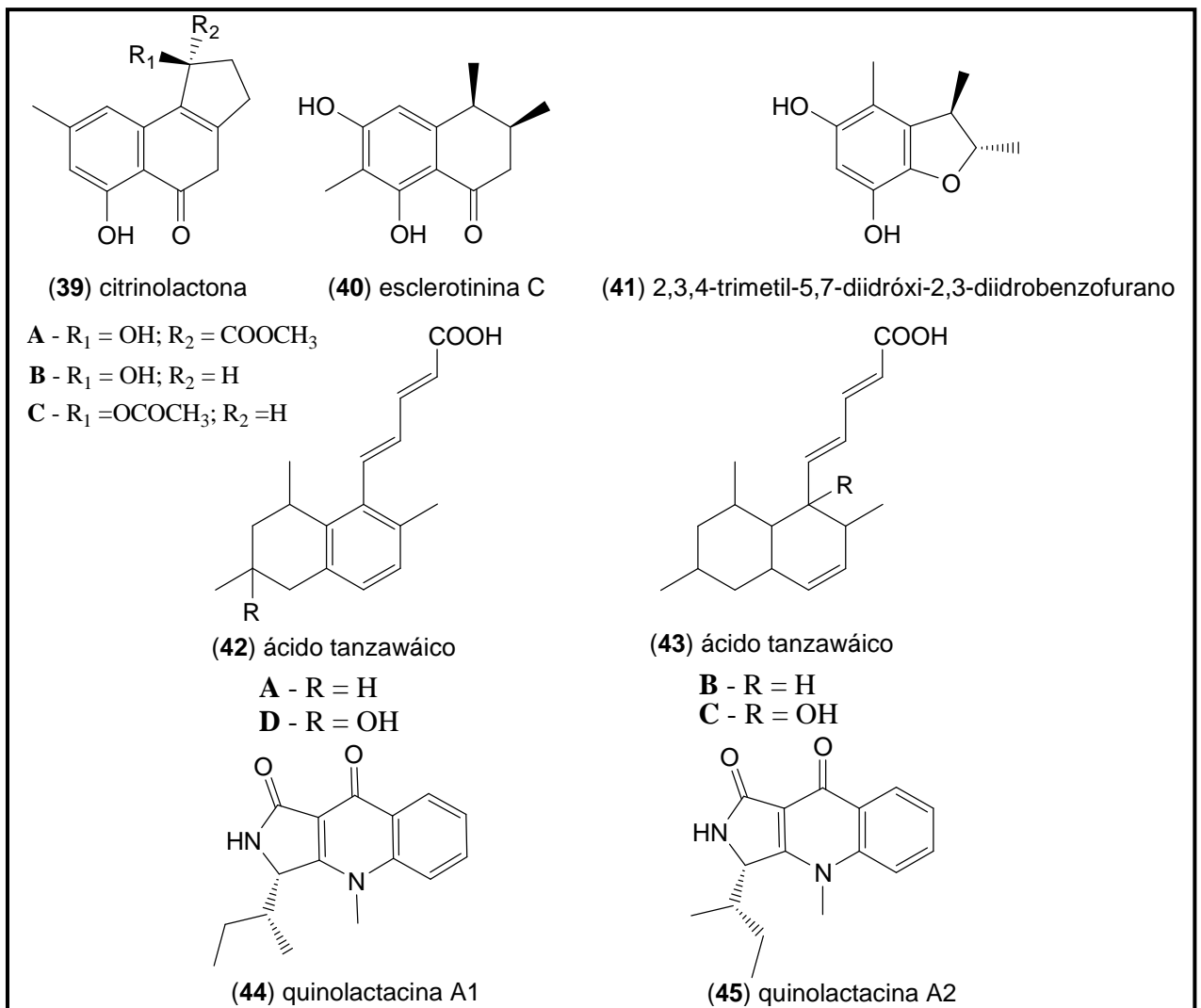
A espécie de *P. citrinum* vem sendo bastante estudada desde meados da década de 30, quando do isolamento da citrinina (31), um derivado policetídeo bastante tóxico (HETHERINGTON; RAISTRICK, 1931).



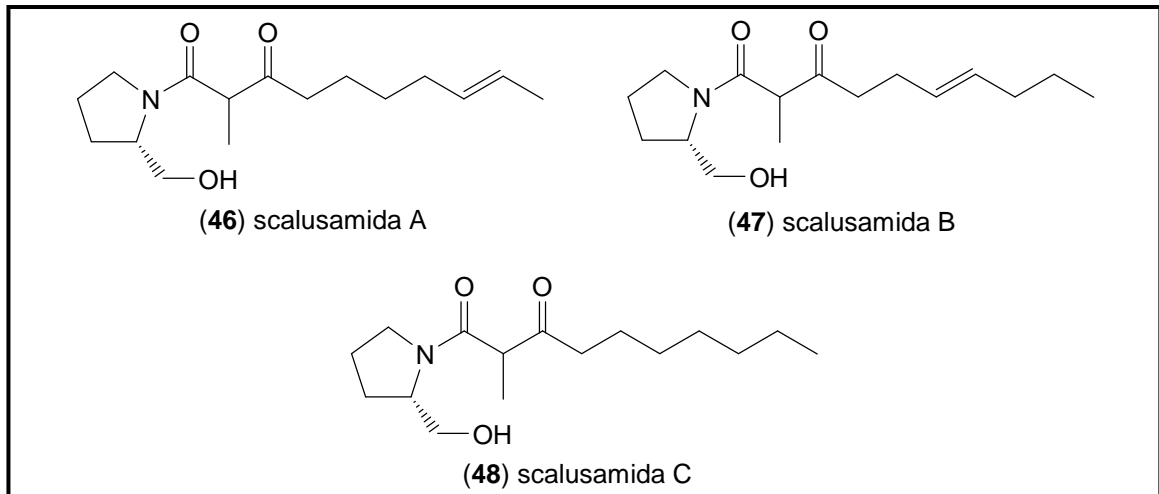
Desde então, muitos derivados da citrinina foram isolados. Dentre estes, podemos citar a penicitrinona (**32**) o penicitrol (**33**) a descarboxidiidrocitrinina (**34**) a citrinina H1 (**35**) e a dicitrinina A (**36**) (CLARCK et al., 2006; WAKANA et al., 2006), os alcalóides quinocitrinina (**37**) (KOZLOVSKY et al., 2003) e citrinadina A (**38**) (TSUDA et al., 2004).



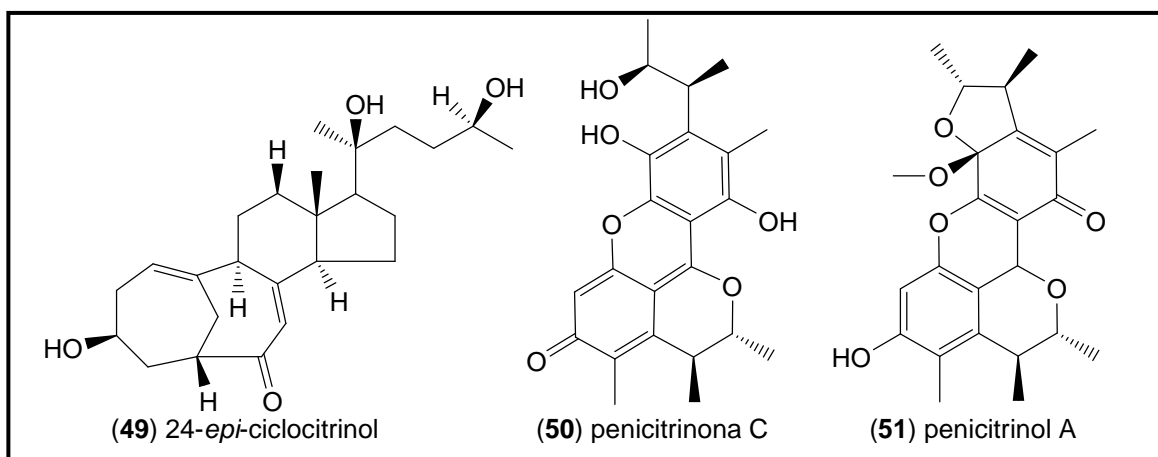
Muitos compostos foram isolados de espécies de *P. citrinum* com variadas atividades biológicas, estas incluem as citrinolactonas (**39**) e esclerotinina C (**40**), que mostraram ser reguladores no crescimento de plantas (KURAMATA et al., 2007). O derivado furano, 2,3,4-trimetil-5,7-diidroxi-2,3-diidrobenzofurano (**41**), possui atividade antioxidante também foi isolado (CHEN et al., 2002). Também os ácidos tanzawáicos A e D (**42**) B e C (**43**), inibidores da produção do ânion superóxido (KURAMOTO et al., 1997). As quinolactacinas A1 (**44**) e A2 (**45**) mostraram inibição frente a enzima acetilcolinesterase que é uma das responsáveis por desencadear o mal de Alzheimer (KIM; SONG; YOO, 2001).



Em 2005 Tsuda e colaboradores isolaram 3 novas amidas pirrolidínicas de uma espécie de *P. citrinum* isolada do trato gastrointestinal de uma espécie de peixe, *Scalus ovifrons*. Estas substâncias receberam o nome de scalusamidas A (46), B (47) e C (48) (TSUDA et al., 2005).



Recentemente novos compostos isolados de espécies de *P. citrinum* foram relatados na literatura, dentre estes podemos citar os esteróis: 24-*epi*-ciclocitrinol (49) (e outros 10 análogos, DU et al., 2008), e os novos dímeros da citrinina: penicitrinona C (50) e penicitrinol A (51) (LU et al., 2008), todos estes compostos são derivados da citrinina.



1.6 Melhoria das condições de crescimento e produção de metabólitos por microrganismos

Os microrganismos têm uma capacidade enorme de se adaptarem a ambientes (tais como diferentes meios de cultura) que não são favoráveis para o seu crescimento e desenvolvimento. Por exemplo, uma pequena alteração nos componentes de um meio de cultura qualquer, bem como temperatura e tempo de crescimento, podem alterar o metabolismo secundário de um microrganismo.

Sendo assim, é necessário realizar uma grande quantidade de experimentos para se encontrar uma condição ideal de crescimento, para que um determinado microrganismo possa vir a produzir metabólitos secundários em maior quantidade e/ou diversidade. Além desse ser um processo demorado, muitas vezes a análise dos resultados pode ser complexa. A utilização do planejamento experimental para se obter uma condição ótima para a produção de metabólitos secundários pode ser uma boa alternativa, pois com poucos experimentos é possível encontrar condições adequadas para a produção de grandes quantidades de metabólitos secundários. (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

Recentemente, alguns trabalhos utilizaram métodos estatísticos para se obter uma maior produção de metabólitos primários, bem como enzimas (LIM et al., 2005; OOIJKAAS et al., 2000; RISPOLI; SHAH, 2007; SHI et al., 2007), e também para a produção de metabólitos secundários bioativos (COCKSHOTT; SULLIVAN, 2001; CHAKRAVARTI; SAHAI, 2002; SAYYAD et al., 2007) por parte de fungos. Também foram realizados estudos de otimização para a produção de xilanase, por *P. oxalicum*, que é uma enzima responsável por regular a digestão animal. As otimizações foram realizadas utilizando o método análise de superfície de resposta e métodos estatísticos (LI et al., 2007).

Todos estes trabalhos, citados no texto acima, fizeram uso de planejamento experimental para a maior produção de apenas um metabólito (primário ou secundário). No entanto nenhum trabalho foi encontrado utilizando métodos estatísticos para se obter, por parte de um microrganismo, maiores quantidades de um extrato bruto contendo diferentes metabólitos secundários.

Capítulo 2

Justificativa e objetivos

Capítulo 2 – Justificativa e objetivos

A busca por novas fontes de metabólitos secundários com atividade biológicas tem se intensificado nos últimos anos. Em nosso grupo, o estudo químico utilizando macrorganismos do ambiente marinho é uma metodologia que vem sendo utilizada desde meados de 1996. Desde então muitos compostos foram isolados, e, destes, vários apresentaram atividades biológicas. O ambiente marinho é um ecossistema rico em diversidade biológica e, por dificuldades de acesso, pouco explorado. Este é um fator relevante na busca por novas fontes produtoras de compostos com interesse farmacológico.

Nos últimos anos renasceu o interesse no isolamento de produtos naturais bioativos isolados a partir de fungos, principalmente devido às seguintes razões: em uma coleta pode-se obter uma grande diversidade de linhagens; o cultivo *in vitro* facilita o isolamento de substâncias em maiores quantidades; pode-se incrementar a diversidade de diferentes classes químicas dos metabólitos isolados; e a geração de espécies mutadas de fungos pode possibilitar o isolamento de novos compostos.

Tendo como base estas informações, o GQOPN – IQSC iniciou em 2000 o primeiro programa de pesquisas brasileiro com o objetivo de se descobrir compostos biologicamente ativos de linhagens fúngicas isoladas a partir do ambiente marinho. Um estudo químico foi realizado, com fungos isolados a partir do ambiente marinho, em 2002 por uma ex-aluna do grupo e os resultados foram publicados na revista Química Nova (VITA-MARQUES, et al., 2008). O extrato bruto obtido da espécie fúngica codificada S1SS30 teve atividade citotóxica e também contra *Mycobacterium tuberculosis*. O extrato bruto obtido da espécie codificada AcSS53 foi ativo contra *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Estas duas linhagens bioativas isoladas por esta aluna foram utilizadas para a realização deste trabalho.

Os objetivos gerais deste trabalho foram os de otimizar a produção de metabólitos secundários por parte de duas linhagens de fungos isoladas do ambiente marinho, visando a produção de uma maior quantidade e diversidade de metabólitos secundários, de maneira a possibilitar a extração, purificação e determinação estrutural destes compostos.

Os objetivos específicos deste trabalho foram os de utilizar as linhagens de fungos *P. oxalicum* e *P. citrinum* isoladas a partir do ambiente marinho para o estudo das condições ótimas de crescimento e produção de metabólitos secundários. Objetivou-se realizar estudos utilizando como ferramenta de análise métodos de planejamento experimental, variando-se as condições de crescimento destas linhagens de fungos, monitorando-se: a) a quantidade de extrato bruto (em massa) produzida por cada uma das duas linhagens e, b) a formação de metabólitos secundários durante o período de incubação das duas linhagens. Através das análises com planejamento experimental, objetivou-se estabelecer condições ótimas para a produção de metabólitos secundários. Uma vez estabelecidas condições ótimas, estas seriam empregadas para um crescimento em maior volume de meio de cultura com as duas linhagens, visando a obtenção de maiores quantidades de extrato bruto, de maneira a se realizar o isolamento e identificação dos componentes produzidos pelas duas linhagens fúngicas.

Capítulo 3

Materiais e métodos

Capítulo 3 – Materiais e métodos

3.1 Técnicas e equipamentos utilizados

3.1.1 Cultivo dos microrganismos

Os microrganismos foram cultivados em meios de cultura líquidos e sólidos. O cultivo em meio de cultura sólido foi realizado em placas de Petri de vidro com 20 cm de diâmetro. Para o cultivo em meio de cultura líquido foram utilizados frascos Schott de 250 mL para o cultivo em pequena escala, e frascos Schott de 500 e 1000 mL para o cultivo em média escala.

O meio de cultura utilizado neste trabalho foi o meio **MF**, de composição: glicose 2%, amido 1%, soytone 2%, peptona 0,5%, extrato de carne 0,03%, extrato de levedura 0,5% (o meio sólido utilizado para preparar placas de Petri contém 2% de ágar) dissolvidos em água do mar artificial contendo os seguintes sais: CaCl_2 1,36 g/L; MgCl_2 9,68 g/L; KCl 0,61 g/L; NaCl 30,00 g/L; Na_2HPO_4 0,14 mg/L; Na_2SO_4 3,47 g/L; NaHCO_3 0,17 g/L; KBr 100 mg/L; SrCl_2 40 mg/L; H_3BO_3 30 mg/L. Pelo fato de trabalhar com linhagens fúngicas isoladas do ambiente marinho, optou-se em utilizar um meio de cultura que contenha sais que simulem uma situação semelhante a encontrada neste ambiente. Este meio de cultura foi então nomeado de meio **MF marinho**.

Para esterilização, dos materiais e meios de cultura, foram utilizadas duas autoclaves: a) autoclave vertical da marca Fabbe modelo 103; b) autoclave vertical da marca Phoenix Equipamentos Científicos modelo AV-50.

O trabalho em ambiente estéril foi realizado em um gabinete de biossegurança (fluxo laminar) da marca Labconco.

Para a incubação das linhagens foi utilizada uma câmara da marca Fauvel Científica Ltda.

3.1.2 Técnicas cromatográficas

3.1.2.1 Extração em fase sólida (EFS)

Para o procedimento de EFS foram utilizadas colunas comerciais pré-empacotadas C₁₈ da marca Phenomenex[®], contendo 2 g de fase estacionária para o cultivo em pequena escala, e de 5 e 10 g de fase estacionária para o cultivo em média escala. Os solventes utilizados foram água purificada e deionizada em um sistema Milli-Q Millipore equipado com resina de troca iônica e filtro biológico, e MeOH grau analítico das marcas QHemis e FMaia.

3.1.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Foram utilizadas as seguintes colunas analíticas:

- Coluna de fase reversa C₁₈ X-terra da marca Waters[®] – dimensões de 50 mm de comprimento por 2,1 mm de diâmetro com 3,5 µm de tamanho da partícula.
- Coluna de fase reversa C₁₈ symmetry da marca Waters[®] – dimensões de 75 mm de comprimento por 4,6 mm de diâmetro com 3,5 µm de tamanho da partícula.
- Coluna de fase reversa C₁₈ Synergi Fusion-RP 80 da marca Phenomenex[®] – dimensões de 250 mm de comprimento por 4,6 mm de diâmetro com 4 µm de tamanho da partícula.

- Coluna de fase reversa C₁₈ Inertsil da marca GL Sciences Inc. – 250 mm de comprimento por 4,6 mm de diâmetro com 5 µm de tamanho da partícula.

Foi utilizada a seguinte coluna semi-preparativa: coluna de fase reversa C₁₈ Inertsil da marca Chromatography Sciences – CSC-Inertsil 150A/ODS2, 250 mm de comprimento por 9,4 mm de diâmetro com 5 µm de tamanho da partícula.

Os cromatógrafos utilizados foram: a) sistema cromatográfico da marca Waters® que consiste de um injetor automático Waters 717 Plus, acoplado a um sistema de controle e bomba modelo Waters 600, acoplado a um detector espectrofotométrico de duplo feixe UV-visível modelo Waters 2487, operado utilizando a plataforma Empower; b) sistema cromatográfico da marca Waters® que consiste em um sistema de controle e bomba modelo Waters 600 acoplado a um detector espectrofotométrico de duplo feixe UV-visível modelo Waters 2487 este equipamento é operado utilizando uma plataforma Millennium.

Os solventes utilizados foram água purificada e deionizada em um sistema Milli-Q Millipore equipado com resina de troca iônica e filtro biológico, MeOH e MeCN de grau cromatográfico de pureza, das marcas Mallinckrodt, J.T. Baker e Tedia Brasil.

3.1.3 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram obtidos utilizando-se os seguintes aparelhos: a) Bruker DRX 400 (9,4 Tesla), operando a 400,35 MHz na frequência do hidrogênio (¹H) e a 100,10 MHz na frequência do carbono (¹³C) no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (DQ-UFSCar); b) Bruker AV-600 (14,1 Tesla) com criosonda, operando a 600 MHz na frequência do hidrogênio (¹H), a 150 MHz na frequência do carbono (¹³C) e a 60 MHz na frequência do nitrogênio (¹⁵N), no

Departamento de Ciências Químicas da Terra e Oceano da Universidade de British Columbia, Vancouver, Canadá.

Para realizar as análises por RMN as amostras foram preparadas utilizando-se solventes deuterados da marca Cambridge Isotopes: MeOH deuterado (MeOH- d_4) e DMSO deuterado (DMSO- d_6). O padrão utilizado como referência interna foi o tetrametilsilano (TMS).

3.1.4 Espectrometria de massas

Para a obtenção dos espectros de massas de baixa resolução foi utilizado um sistema cromatográfico da marca Waters[®] que consiste em um sistema de controle Alliance modelo Waters 2695 acoplado com detector espectrofotométrico UV-visível modelo Waters 2696 com detector de arranjo de fotodiodos também acoplado a um detector espectrofotométrico de massas modelo Waters Micromass ZQ 2000 operado utilizando plataforma Empower. A sigla utilizada para este equipamento foi nomeada por CLAE-UV-EM.

Para a obtenção dos espectros de alta resolução foi utilizado o espectrômetro de massas da marca Bruker Hewlett-Packard 1100 Esquire-LC, do Departamento de Ciências Químicas da Terra e Oceano da Universidade de British Columbia, Vancouver, Canadá.

3.2 Coleta e isolamento dos microrganismos

Todo o procedimento de coleta, isolamento e preservação das linhagens fúngicas estudadas foi realizado em 2002 pela então ex-aluna de mestrado Aline Maria de Vita Marques (VITA-MARQUES, 2003). As linhagens foram inicialmente isoladas em meio de cultura MF marinho. Este meio de cultura também continha o

antibiótico rifampicina 0,3% com a finalidade de impedir o crescimento de bactérias. A coleta foi realizada em 6 de abril de 2002, na praia do Cabelo Gordo de Fora em São Sebastião, litoral norte do Estado de São Paulo. Dentre outras amostras, foram coletadas as de sedimento marinho e de uma espécie de alga *Caulerpa* sp.

Da amostra de sedimento marinho foi isolada uma linhagem de fungo codificada por **S1SS30** e posteriormente renomeada como **F30** (figura 1A). De uma espécie de alga *Caulerpa* sp. foi isolada uma linhagem codificada por **AcSS53** e posteriormente renomeada como **F53** (figura 1B).

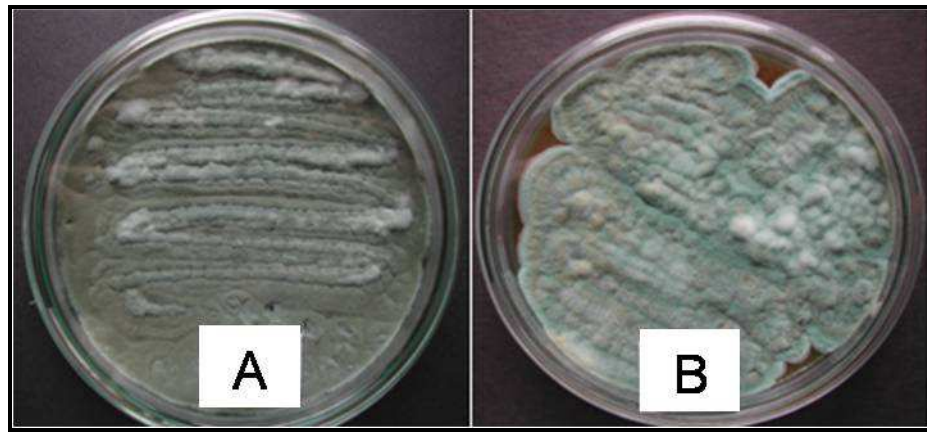


Figura 1 – Placas de Petri contendo meio de cultura MF sólido inoculadas com as linhagens de: **A)** *P. oxalicum* (F30) e **B)** *P. citrinum* (F53)

3.3 Caracterização e identificação dos microrganismos

Os microrganismos foram identificados no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA – Unicamp) utilizando-se técnicas de identificação por taxonomia molecular e convencional.

A taxonomia molecular foi realizada da seguinte maneira: fragmentos das regiões ITS e D1/D2 foram amplificados a partir do DNA genômico extraído das amostras. O material foi purificado em coluna e submetido ao sequenciamento automático no sistema MegaBACE. As sequências foram analisadas utilizando o

BLAST do GenBank e com isso foi possível construir as árvores filogenéticas para F30 e F53.

A taxonomia convencional foi realizada da seguinte maneira: as linhagens foram repicadas em placas de Petri contendo os meios de cultura CYA (5; 28 e 37 °C), MEA (28 °C) e G25N (28 °C) e incubadas por 7 dias. Após este período foram realizadas análises macro e microscópicas das culturas, incluindo entre outras, diâmetro das colônias, coloração de micélio, presença de corpos de frutificação, tamanho e forma dos esporos e características de suas paredes celulares.

3.4 Cultivo em pequena escala

As linhagens de *Penicillium oxalicum* e *Penicillium citrinum* foram cultivadas em meio de cultura MF marinho por um período de 14 dias de incubação, com pH inicial 5,8 e temperatura de incubação ambiente. Este cultivo foi nomeado de experimento “inicial” e foi utilizado como controle para verificar-se uma maior produção de metabólitos secundários por parte das duas linhagens de *Penicillium* estudadas.

3.5 Planejamento fatorial fracionário

O planejamento experimental faz uso de métodos estatísticos de análise para a realização de otimizações visando a obtenção de um melhor rendimento para um determinado experimento. Estas otimizações, primeiramente, necessitam da realização de um planejamento experimental. Neste trabalho optou-se em utilizar um **Planejamento Fatorial Fracionário com Ponto central**. Quando utiliza-se tal planejamento deve-se decidir quais e quantos parâmetros serão necessários para montar tal Planejamento Fatorial Fracionário (PFF).

Neste trabalho decidiu-se utilizar 5 parâmetros experimentais que foram: **a)** concentração total de sais do meio de cultura; **b)** concentração total de nutrientes; **c)** tempo de incubação; **d)** pH inicial do meio de cultura; **e)** temperatura de incubação.

A fórmula utilizada para encontrar-se o número de experimentos para um PFF é 2^{n-1} onde **n** é o número de parâmetros experimentais. Utilizando-se 5 parâmetros, tem-se, então, $2^{(5-1)} = 2^{(4)} = 16$ experimentos diferentes a serem realizados para o Planejamento Fatorial Fracionário com ponto central. Um planejamento fatorial é composto de valores de máximo (+), mínimo (-) e pontos centrais (0) para cada parâmetro experimental. O ponto central corresponde a média aritmética do valor máximo e mínimo de cada variável. Utilizou-se os seguintes valores de máximo, mínimo e ponto central para cada um dos parâmetros experimentais:

a) Concentração total de todos os sais do meio de cultura – valor máximo (+) para esta variável: 80% da concentração total de todos os sais; valor mínimo (-) desta variável: 20% da concentração total de todos os sais e ponto central (0): 50% da concentração de todos os sais.

b) Concentração total de todos os nutrientes do meio de cultura – valor máximo (+) para esta variável: 60% da concentração total de nutrientes; valor mínimo (-) para esta variável: 10% da concentração total de nutrientes e ponto central (0): 35% da concentração total de nutrientes.

c) Período de incubação em dias – valor máximo (+) de 28 e mínimo (-) de 14 dias e ponto central (0) com 21 dias.

d) pH inicial do meio de cultura – valor máximo (+): pH 8; valor mínimo (-): pH 6 e ponto central (0): pH 7.

e) Temperatura de incubação – valor máximo de 30°C e mínimo de 15°C e ponto central com temperatura de 23°C.

Desta maneira, definiu-se os parâmetros experimentais de cada experimento e estabeleceu-se um planejamento fatorial com valores de máximo e mínimo para cada variável, além de 3 pontos centrais (realizados em triplicata). As tabelas 1 e 2 ilustram os experimentos realizados.

Tabela 1 – Planejamento fatorial fracionário com ponto central.

Experimento	% de sal	% de nutrientes	Tempo em dias	pH inicial	Temperatura
1	80	60	28	8	30
2	20	60	28	8	15
3	80	10	28	8	15
4	20	10	28	8	30
5	80	60	14	8	15
6	20	60	14	8	30
7	80	10	14	8	30
8	20	10	14	8	15
9	80	60	28	6	15
10	20	60	28	6	30
11	80	10	28	6	30
12	20	10	28	6	15
13	80	60	14	6	30
14	20	60	14	6	15
15	80	10	14	6	15
16	20	10	14	6	30
Pontos centrais					
17	50	35	21	7	23
18	50	35	21	7	23
19	50	35	21	7	23

Tabela 2 – Planejamento fatorial fracionário com ponto central (valores de máximo e mínimo).

Experimento	% de sal	% de nutrientes	Tempo em dias	pH inicial	Temperatura
1	+1	+1	+1	+1	+1
2	-1	+1	+1	+1	-1
3	+1	-1	+1	+1	-1
4	-1	-1	+1	+1	+1
5	+1	+1	-1	+1	-1
6	-1	+1	-1	+1	+1
7	+1	-1	-1	+1	+1
8	-1	-1	-1	+1	-1
9	+1	+1	+1	-1	-1
10	-1	+1	+1	-1	+1
11	+1	-1	+1	-1	+1
12	-1	-1	+1	-1	-1
13	+1	+1	-1	-1	+1
14	-1	+1	-1	-1	-1
15	+1	-1	-1	-1	-1
16	-1	-1	-1	-1	+1
Pontos centrais					
17	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0

Este planejamento foi construído intercalando-se os valores de máximo e mínimo, para cada variável, da seguinte maneira:

- a)** coluna da % de sais – os valores foram dispostos intercalando-se um máximo e um mínimo (até o experimento 16);
- b)** Coluna da % de nutrientes – os valores foram dispostos intercalando-se dois máximos e dois mínimos (até o experimento 16);
- c)** Coluna do tempo (em dias) – os valores foram dispostos intercalando-se quatro máximos e quatro mínimos (até o experimento 16);
- d)** Coluna do pH inicial – os valores foram dispostos intercalando-se oito máximos e oito mínimos;
- e)** Coluna da temperatura – os valores de máximo e mínimo foram definidos pela multiplicação, em termos de sinais de máximo (+) e mínimo (-), das colunas **a . b . c . d**.

Assim, para a variável temperatura, pode-se ilustrar como exemplo o experimento 3 (tabelas 1 e 2),

Experimento	% de sal	% de nutrientes	Tempo em dias	pH inicial	Temperatura
3	80 (+)	10 (-)	28 (+)	8 (+)	15 (-)

em que tem-se: salinidade do meio de cultura [80, valor máximo, sinal positivo (+)], nutrientes [10, valor mínimo, sinal negativo (-)], tempo de crescimento em dias [28 valor máximo, sinal positivo (+)] e pH inicial [8, valor máximo, sinal positivo (+)]. Com isso multiplica-se as quatro colunas (em termos de sinais) e obtém-se: **(+) . (-) . (+) . (+) = (-)**. Portanto, a temperatura para este experimento deve ter valor mínimo (devido ao sinal negativo), que é de 15 °C. Os pontos centrais (experimentos 17, 18 e 19) são os valores médios de cada uma das variáveis utilizadas e tem valor “0” (zero).

Cada um dos 16 experimentos do PFF, e 3 pontos centrais, foram realizados da seguinte maneira: em meio de cultura líquido foram inoculados 10^5 esporos de cada linhagem fúngica. Para a obtenção da solução de esporos a partir das linhagens fúngicas o seguinte procedimento foi empregado: os fungos (*P. citrinum* e *P. oxalicum*) foram repicados para tubos de ensaio pyrex (inclinados) contendo 3 mL de meio de cultura em ágar e incubados a 25 °C. Após 7 dias de cultivo, foram adicionados 3 mL de uma solução 0,5% de Tween 80 (1 mL por vez) o ágar foi raspado e filtrado em fibra de vidro em ambiente estéril. Os esporos assim adquiridos foram contados utilizando-se um hemocitômetro (câmara de Neubauer) e, após contagem, transferidos para frascos Schott de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura preparados, de acordo com os experimentos do PFF, sem ágar, com uma média de 10^5 esporos por mL.

Após o período de crescimento de cada experimento, cada inóculo contendo meio de cultura e micélio foi filtrado em membranas de fibra de vidro (com

porosidade de 0,7 μm). Após a filtração foi obtida uma fração líquida (caldo MF do meio de cultura) e uma fração sólida (micélio). Ao micélio separado foram adicionados 10 mL de MeOH (1 minuto em ultra-som) e filtrado novamente em membranas. Obteve-se então o extrato metanólico do micélio (ExMeOH) o qual foi evaporado e pesado. Após o micélio secar totalmente, este foi pesado. Do meio de cultura líquido (caldo MF filtrado) foi realizada uma extração em fase sólida (EFS) em coluna de fase reversa C_{18} de 2 g. Após condicionar a coluna com 10 mL de H_2O ; 10 mL de MeOH/ H_2O 1:1; 10 mL de MeOH 100%; 10 mL de MeOH/ H_2O 1:1 e 10 mL de H_2O , foram aplicados os 50 mL do meio de cultura de uma só vez. Em seguida, a coluna foi “lavada” com 10 mL de água para eliminar sais e aminoácidos presentes no meio de cultura. Em seguida, a coluna foi eluída com um gradiente de MeOH/ H_2O e quatro frações foram obtidas: Fração 1 (**F1**) – 25:75 MeOH/ H_2O (10 mL); Fração 2 (**F2**) – 1:1 MeOH/ H_2O (10 mL); Fração 3 (**F3**) – 75:25 MeOH/ H_2O (10 mL) e Fração 4 (**F4**) – 100% de MeOH (10 mL).

O solvente das frações da EFS e dos ExMeOH foi evaporado em um sistema de centrifugação a vácuo (speedvac). Após a evaporação total do solvente, todas as amostras foram pesadas e diluídas a uma concentração final de 1 mg/mL. As amostras assim obtidas (ExMeOH e frações de EFS) de todos os experimentos realizados para as duas linhagens de fungos foram submetidas à análise por CLAE-UV (Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência acoplado a um detector de Arranjo de diodos) em uma coluna de fase reversa C_{18} Synergi Fusion-RP 80 da marca Phenomenex[®], de dimensões 250 x 4,6 mm com 4 μm de tamanho de partícula com um gradiente metanol-água por 40 minutos com a seguinte composição: início com 5% de MeOH e 95% de H_2O ; mudança linear, da composição de solvente, até 20 minutos, quando a composição chega a 100% de MeOH. Esta composição

permanece até 25 minutos quando retorna à inicial (5% de MeOH e 95% de H₂O, por 15 minutos), recondicionando-se a coluna para uma próxima injeção de uma nova amostra.

Todos os experimentos do PFF foram, então, analisados através das integrais das áreas dos cromatogramas, no intervalo de 10 a 26 minutos, conforme ilustra a Figura 2.

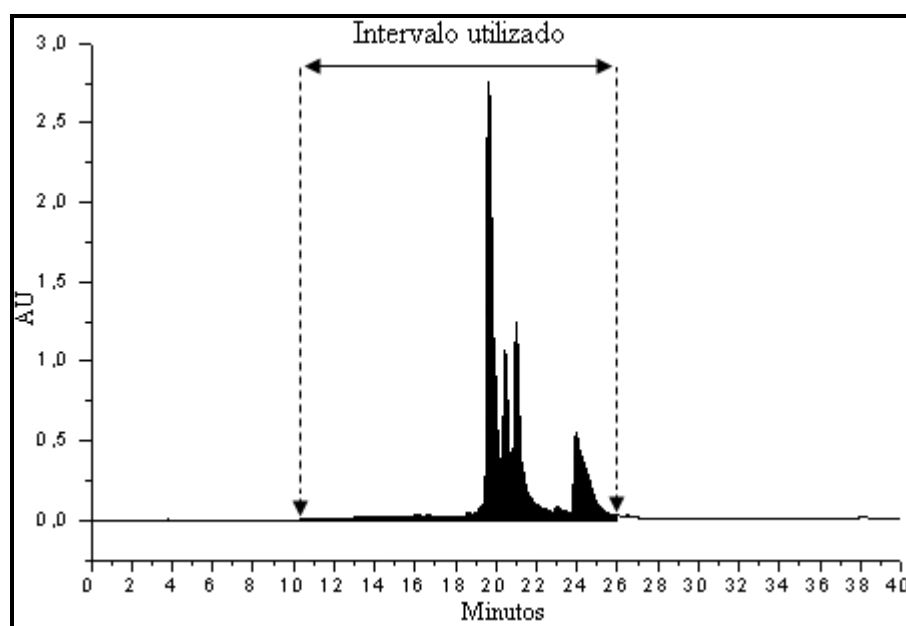
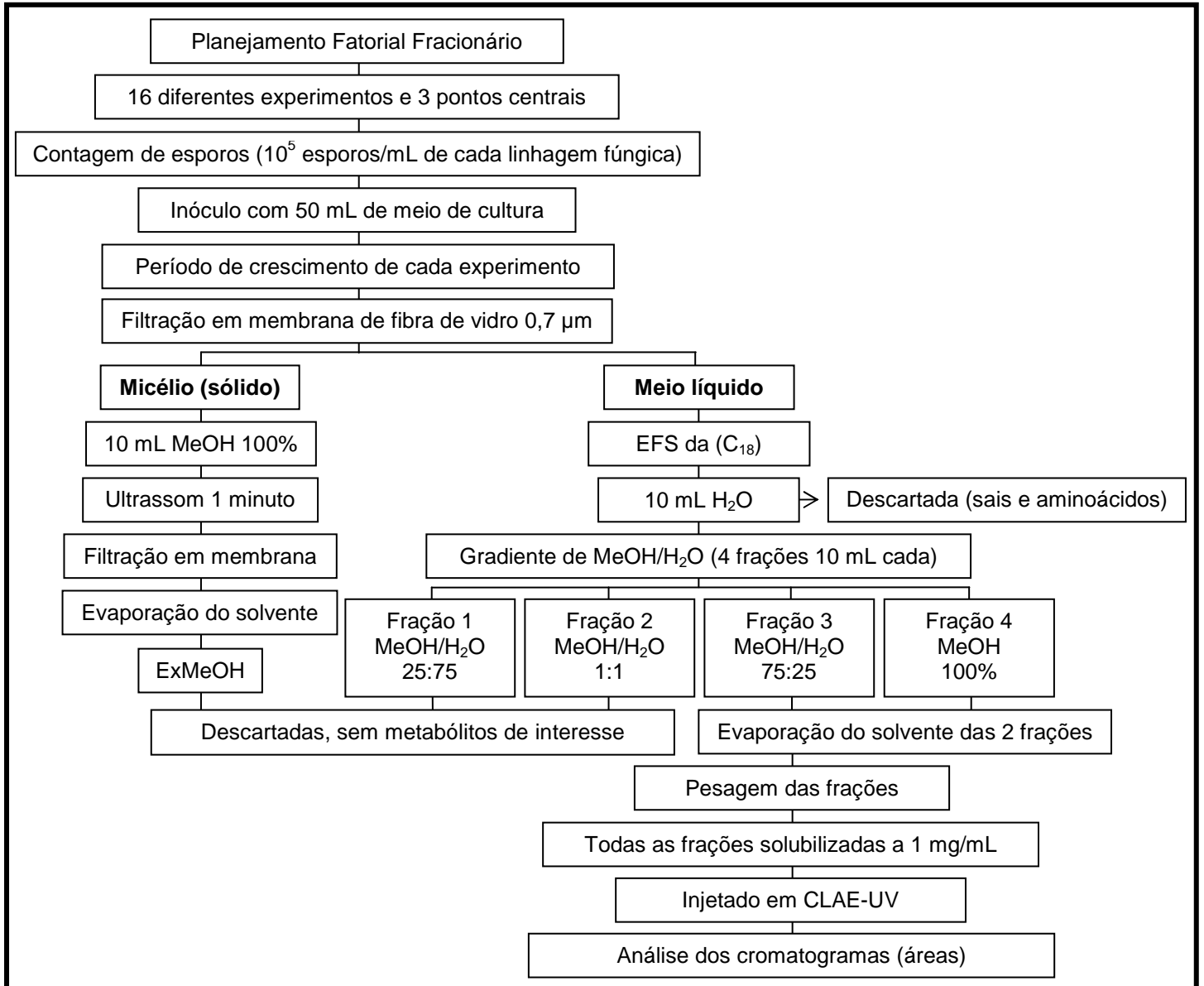


Figura 2 – Intervalo utilizado para cálculo das áreas dos cromatogramas. O intervalo em negrito do cromatograma corresponde a área de 2,546. Análise realizada em CLAE-UV. Condições experimentais: coluna de fase reversa C₁₈ Synergi Fusion-RP 80 da marca Phenomenex®, de dimensões 250 x 4,6 mm com 4 µm de tamanho de partícula com um gradiente de MeOH/H₂O por 40 minutos, monitorados em comprimento de onda de 230 nm.

O extrato metanólico do micélio e as Frações 1 e 2 da EFS foram descartadas por não apresentar metabólitos de interesse. O extrato metanólico do micélio apresentou muitos sais e nutrientes do meio de cultura, e a quantidade de metabólitos secundários observada neste foi insignificante. A Fração 1 da EFS, de composição 25:75 MeOH/H₂O, faz com que esta fração contenha muitos metabólitos primários (nutrientes do meio de cultura). O mesmo foi observado com a Fração 2

(1:1 MeOH/H₂O) de EFS. Todo o processo de cultivo, filtração, extração e análise por CLAE-UV está ilustrado no fluxograma do esquema 1.



Esquema 1 – Fluxograma ilustrando a realização dos experimentos do Planejamento Fatorial Fracionário, filtração, extração e análise por CLAE-UV.

Após realizar as análises das áreas dos cromatogramas para cada experimento do PFF de cada uma das duas linhagens de *Penicillium* estudadas, foram obtidos os efeitos (contrastes) de interação das variáveis utilizadas para o cultivo das linhagens.

3.5.1 Efeitos de interação de 1ª ordem

Após realizar os cálculos das integrais de todos os cromatogramas das frações 3 e 4 da EFS de todos os experimentos foi possível analisar os efeitos de interação de 1ª (efeito de uma variável) e 2ª ordem (efeito de duas variáveis). Para realizar as análises dos efeitos de interação foi utilizada uma planilha no programa Excel. Para exemplificar estes cálculos de interação de 1ª ordem, nomeou-se as variáveis do planejamento fatorial em: **(a)** % de salinidade [sais]; **(b)** % de nutrientes [nutrientes]; **(c)** tempo em dias; **(d)** pH inicial; **(e)** temperatura.

Os cálculos dos efeitos de interação de 1ª ordem foram efetuados através da multiplicação dos sinais de máximo ou mínimo (mostrados na Tabela 2, página 33) pelos valores encontrados para as áreas dos cromatogramas. Por exemplo, os valores da coluna “**a**” (concentração salina) foram multiplicados pelas áreas dos cromatogramas identificado pela coluna “**f**” (a . f, veja na tabela 3 logo abaixo). Em seguida, foi realizada a soma dos valores positivos (y^+) e soma dos valores negativos (y^-), separadamente. Após, foi realizada a soma entre $y^+ + y^-$, este resultado foi dividido por 8, $(y^+ + y^-)/8$, pois existem 8 valores positivos e 8 negativos para cada coluna. Por exemplo, a tabela 3 mostra os cálculos realizados para as áreas dos cromatogramas da Fração 3 da EFS de todos os experimentos de crescimento da linhagem de *P. oxalicum* (F30-F3). A soma dos valores positivos foi: $y^+ = 3,985$, e soma dos valores negativos foi: $y^- = - 4,851$, então o resultado de $y^+ + y^- = - 0,866$. Este resultado foi dividido por 8. Logo, tem-se - **0,108**, este valor é o efeito da influência que a variável sais (a) tem na produção de metabólitos secundários detectados na fração 3 da EFS, obtida a partir da linhagem de *P. oxalicum*. A sigla utilizada para este efeito foi nomeada de **Ea** (efeito da variável **a**).

Tabela 3 – Exemplo dos cálculos realizados para se obter os efeitos de 1ª ordem (uma variável).

Exp.	a	b	c	d	e	Áreas F30-F3* (f)	a . f	b . f	c . f	d . f	e . f	
1	+	+	+	+	+	1,157	1,157	1,157	1,157	1,157	1,157	
2	-	+	+	+	-	0,671	-0,671	0,671	0,671	0,671	-0,671	
3	+	-	+	+	-	0,284	0,284	-0,284	0,284	0,284	-0,284	
4	-	-	+	+	+	0,525	-0,525	-0,525	0,525	0,525	0,525	
5	+	+	-	+	-	0,566	0,566	0,566	-0,566	0,566	-0,566	
6	-	+	-	+	+	0,977	-0,977	0,977	-0,977	0,977	0,977	
7	+	-	-	+	+	0,737	0,737	-0,737	-0,737	0,737	0,737	
8	-	-	-	+	-	0,498	-0,498	-0,498	-0,498	0,498	-0,498	
9	+	+	+	-	-	0,191	0,191	0,191	0,191	-0,191	-0,191	
10	-	+	+	-	+	0,403	-0,403	0,403	0,403	-0,403	0,403	
11	+	-	+	-	+	0,180	0,180	-0,180	0,180	-0,180	0,180	
12	-	-	+	-	-	0,187	-0,187	-0,187	0,187	-0,187	-0,187	
13	+	+	-	-	+	0,361	0,361	0,361	-0,361	-0,361	0,361	
14	-	+	-	-	-	0,540	-0,540	0,540	-0,540	-0,540	-0,540	
15	+	-	-	-	-	0,509	0,509	-0,509	-0,509	-0,509	-0,509	
16	-	-	-	-	+	1,050	-1,050	-1,050	-1,050	-1,050	1,050	
						Soma y^+	3,985	4,866	3,598	5,415	5,390	
						Soma y^-	-4,851	-3,970	-5,238	-3,421	-3,446	
						Soma $y^+ + y^-$	-0,866	0,896	-1,640	1,994	1,944	
						Efeito da variável (Ea, b, c, d, e)	$(y^+ + y^-)/8$	-0,108	0,112	-0,205	0,249	0,243

* Áreas dos cromatogramas oriundos das análises por CLAE da fração F30-F3 – Fração 3 da EFS (75:25 MeOH/H₂O) de cada um dos experimentos de crescimento de *P. oxalicum*.

Desta forma, todos estes cálculos foram realizados para todas as variáveis (a, b, c, d, e) em função das áreas dos cromatogramas das frações 3 e 4 da EFS (F3, F4, respectivamente) da seguinte maneira: **a x área F3** (Ea para a F3); **b x área F3** (Eb para a F3); **c x área F3** (Ec para a F3); **d x área F3** (Ed para a F3); **e x área F3** (Ee para a F3), e assim por diante. Com isso tem-se 5 efeitos de interação de 1ª ordem **Ea; Eb; Ec; Ed; Ee** para as frações F3 e outra série para a fração F4 da EFS do meio de cultura das duas linhagens de *Penicillium*.

3.5.2 Efeitos de interação de 2ª ordem

Para exemplificar os cálculos de interação de 2ª ordem, também nomeou-se as variáveis do planejamento fatorial em: **(a)** % de salinidade; **(b)** % de nutrientes; **(c)** tempo em dias; **(d)** pH inicial; **(e)** temperatura. Os cálculos dos efeitos de

interação de 2ª ordem (efeito confundido para duas variáveis) foram efetuados através da multiplicação dos sinais de máximo e mínimo (Tabela 2, página 33) de duas variáveis, pelos valores encontrados para as áreas dos cromatogramas. Por exemplo, os valores da coluna “a” (concentração salina) foram multiplicados pelos valores da coluna “b” (concentração de nutrientes) que foram multiplicados pelas áreas dos cromatogramas identificado pela coluna “f” (a . b . f, veja na tabela 4 logo abaixo). Em seguida, foi realizada a soma dos valores positivos (y^+) e soma dos valores negativos (y^-), separadamente. Após, foi realizada a soma entre $y^+ + y^-$, este resultado foi dividido por 8, $(y^+ + y^-)/8$, pois existem 8 valores positivos e 8 negativos para cada coluna. Por exemplo, a tabela 4 representa os cálculos realizados para as áreas dos cromatogramas da Fração 3 da EFS para cada um dos experimentos de crescimento com a linhagem de *P. oxalicum* (F30-F3). A soma dos valores positivos foi: $y^+ = 4,535$, e dos valores negativos foi: $y^- = - 4,301$, então o resultado de $y^+ + y^- = 0,234$, e, finalmente, este resultado dividido por 8 tem-se **0,029**. Após todos estes cálculos chegou-se ao resultado para o efeito (influência) que a interação entre a concentração de sais (a) e concentração de nutrientes (b) teve na produção de metabólitos secundários para a Fração 3 de EFS da linhagem de *P. oxalicum*. A sigla utilizada para este efeito foi nomeada de **Eab** (efeito da interação entre as variáveis a e b).

Tabela 4 – Exemplo dos cálculos realizados para se obter os efeitos de 2ª ordem (duas variáveis).

Exp.	a	b	C	d	e	f*	a.b.f	a.c.f	a.d.f	a.e.f	b.c.f	b.d.f	b.e.f	c.d.f	c.e.f	d.e.f
1	+	+	+	+	+	1,157	1,157	1,157	1,157	1,157	1,157	1,157	1,157	1,157	1,157	1,157
2	-	+	+	+	-	0,671	-0,671	-0,671	-0,671	0,671	0,671	0,671	-0,671	0,671	-0,671	-0,671
3	+	-	+	+	-	0,284	-0,284	0,284	0,284	-0,284	-0,284	-0,284	0,284	0,284	-0,284	-0,284
4	-	-	+	+	+	0,525	0,525	-0,525	-0,525	-0,525	-0,525	-0,525	-0,525	0,525	0,525	0,525
5	+	+	-	+	-	0,566	0,566	-0,566	0,566	-0,566	-0,566	0,566	-0,566	-0,566	0,566	-0,566
6	-	+	-	+	+	0,977	-0,977	0,977	-0,977	-0,977	-0,977	0,977	0,977	-0,977	-0,977	0,977
7	+	-	-	+	+	0,737	-0,737	-0,737	0,737	0,737	0,737	-0,737	-0,737	-0,737	-0,737	0,737
8	-	-	-	+	-	0,498	0,498	0,498	-0,498	0,498	0,498	-0,498	0,498	-0,498	0,498	-0,498
9	+	+	+	-	-	0,191	0,191	0,191	-0,191	-0,191	0,191	-0,191	-0,191	-0,191	-0,191	0,191
10	-	+	+	-	+	0,403	-0,403	-0,403	0,403	-0,403	0,403	-0,403	0,403	-0,403	0,403	-0,403
11	+	-	+	-	+	0,180	-0,180	0,180	-0,180	0,180	-0,180	0,180	-0,180	-0,180	0,180	-0,180
12	-	-	+	-	-	0,187	0,187	-0,187	0,187	0,187	-0,187	0,187	0,187	-0,187	-0,187	0,187
13	+	+	-	-	+	0,361	0,361	-0,361	-0,361	0,361	-0,361	-0,361	0,361	0,361	-0,361	-0,361
14	-	+	-	-	-	0,540	-0,540	0,540	0,540	0,540	-0,540	-0,540	-0,540	0,540	0,540	0,540
15	+	-	-	-	-	0,509	-0,509	-0,509	-0,509	-0,509	0,509	0,509	0,509	0,509	0,509	0,509
16	-	-	-	-	+	1,050	1,050	1,050	1,050	-1,050	1,050	1,050	-1,050	1,050	-1,050	-1,050
						Soma y⁺	4,535	4,877	4,924	4,331	5,216	5,297	4,376	5,097	4,378	4,823
Cálculos						Soma y⁻	-4,301	-3,959	-3,912	-4,505	-3,620	-3,539	-4,460	-3,739	-4,458	-4,013
						Soma y⁺ + y⁻	0,234	0,918	1,012	-0,174	1,596	1,758	-0,084	1,358	-0,080	0,810
Efeitos						(y⁺ + y⁻)/8	0,029	0,115	0,127	-0,022	0,200	0,220	-0,011	0,170	-0,010	0,101

* Áreas dos cromatogramas oriundos das análises por CLAE da fração F30-F3 – Fração 3 da EFS (75:25 MeOH/H₂O) de cada um dos experimentos de crescimento de *P. oxalicum*.

Desta forma os cálculos foram realizados para todas as variáveis (a, b, c, d, e) em função das áreas dos cromatogramas das frações de EFS (F3, F4) da seguinte maneira: **a x b x área F3** (Eab da F3); **a x c x área F3**(Eac da F3); **a x d x área F3** (Ead da F3); **a x e x área F3** (Eae da F3); **b x c x área F3** (Ebc da F3); **b x d x área F3** (Ebd da F3); e assim por diante. Com isso tem-se 10 efeitos de interação de 2ª ordem **Eab; Eac; Ead; Eae; Ebc; Ebd; Ebe; Ecd; Ece; Ede** para as frações F3 e outra série idêntica para as frações F4 da EFS do meio de cultura das linhagens de *Penicillium*.

3.5.3 Efeito significativo e gráfico de probabilidades

Ao utilizarmos um PFF com a finalidade de obter-se um melhor rendimento na produção de metabólitos secundários para um determinado experimento, na verdade

analisa-se qual ou (quais) fatores ou variáveis influenciam para melhorar tais resultados. Em uma análise multivariada, quando um fator (ou variável) de um experimento qualquer influencia de maneira a promover um melhor rendimento, diz-se que este efeito foi **significativo**. Ou seja, que este fator ou variável realmente influenciou para melhorar o rendimento de um determinado experimento. Para verificar se um fator ou variável foi significativo, deve-se analisar os efeitos que estes indicaram quando analisados isoladamente (efeito de 1ª ordem) e em conjunto (efeito de 2ª ordem). Os cálculos para se encontrar estes efeitos foram explicados nos itens 3.5.1 e 3.5.2 (respectivamente, páginas 38 e 39).

Os fatores ou variáveis significativos foram obtidos através das análises de gráficos de probabilidades. Para exemplificar como isto foi realizado será utilizada a Fração 3 da EFS obtida de *P. oxalicum* (F30-F3). Em nosso trabalho uma variável é dita **significativa** quando esta influencia em uma maior produção de metabólitos secundários, este melhor rendimento foi identificado através da verificação no aumento da área do intervalo do cromatograma. Pode-se destacar na figura 3 o gráfico de probabilidades obtido para a Fração 3, da EFS dos experimentos de crescimento de *P. oxalicum*. Os efeitos utilizados para a construção deste gráfico estão dispostos nas tabelas 3 e 4 (respectivamente, páginas 39 e 41) .

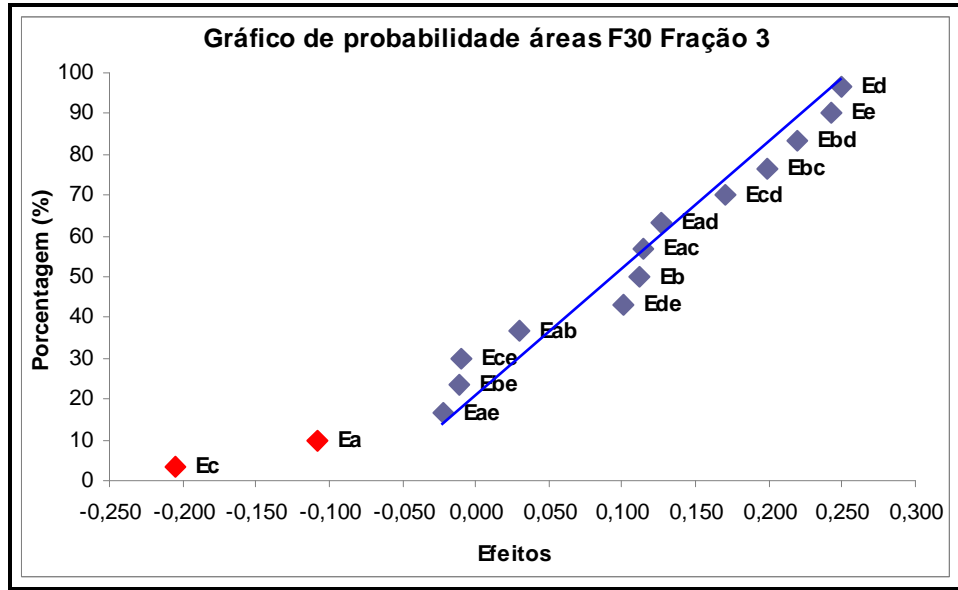


Figura 3 – Exemplo de obtenção dos gráficos de probabilidade para os efeitos de 1ª e 2ª ordem. Cálculos realizados para a Fração 3 da EFS obtidos dos experimentos de crescimento de *P. oxalicum*. Destacado em vermelho estão os efeitos significativos (Ec efeito do tempo de incubação e Ea efeito da [sais]).

A análise dos gráficos de probabilidade para encontrar qual (ou quais) variável (ou variáveis) foi (ou foram) significativas é feita da seguinte maneira: na figura 3 pode-se observar destacado em vermelho dois efeitos isolados (distantes) da grande maioria dos demais. Estes efeitos que se distanciam tanto para os valores positivos quanto para os valores negativos, ou seja, aqueles efeitos que não estejam alinhados e ou agrupados (no gráfico da figura 3 temos uma linha azul que destaca este alinhamento e agrupamento), são os efeitos significativos. Portanto, para o gráfico da figura 3, são considerados como efeitos significativos **Ea** (efeito da [sais]) e **Ec** (efeito do tempo de incubação).

Ainda analisando o gráfico apresentado na figura 3, observando-se os valores dos efeitos destacados em vermelho percebe-se que ambos são negativos. Isso indica que deve-se utilizar as variáveis [sais] (a) e tempo (c) em seus níveis menores, ou seja, 20% da concentração de todos os sais e tempo de 14 dias de

incubação. As variáveis restantes, [nutrientes], pH inicial e temperatura, não se mostraram significativos para uma maior produção de metabólitos secundários.

3.5.4 *P. oxalicum*

Após obter todas as frações da EFS dos meios de cultura oriundos dos experimentos de crescimento de *P. oxalicum* todas estas frações foram analisadas por CLAE-UV. Desta forma, foram obtidas as áreas dos cromatogramas das frações 3 e 4 da EFS de cada experimento de crescimento. Com estes resultados, todo o procedimento de análise dos efeitos de 1^a e 2^a ordem, (citado nos itens 3.5.1, 3.5.2 e 3.5.3) foi efetuado para a linhagem de *P. oxalicum*. Os cálculos foram realizados com base na integral da área do cromatograma e na relação entre a área do cromatograma e a massa da fração correspondente obtida da EFS (relação área/massa). Após estas análises foi possível estabelecer uma condição para o meio de cultura que possibilitasse uma maior produção de metabólitos secundários por parte de *P. oxalicum*.

3.5.5 *P. citrinum*

Exatamente o mesmo procedimento descrito acima (item 3.5.4), foi empregado para a análise das condições de crescimento e produção de metabólitos secundários por *P. citrinum*.

3.6 Cultivo em média escala

Após realizar as análises multivariadas, para cada uma das duas linhagens de *Penicillium* estudadas, foi possível concluir quais os valores dos parâmetros devem ser utilizados para o crescimento em maior volume de meio de cultura ótimo (2 litros,

8 frascos Schott de 500 mL de capacidade contendo 250 mL de meio de cultura cada) para cada linhagem estudada.

Comparando-se o procedimento utilizado para os experimentos de produção em pequena escala (experimentos do PFF) com o cultivo em média escala, houve apenas uma mudança, que foi no processo de filtração. Optou-se em não utilizar a membrana de fibra de vidro pelo fato desse tipo de membrana reter partículas sólidas muito pequenas (do micélio), provocando um “entupimento” desta e, com isso, aumentando muito o tempo de filtração do meio de cultura. Para minimizar este problema foi realizada uma filtração em um funil de vidro sinterizado contendo, aproximadamente 10 g de celite (terra de diatomáceas). Neste processo a fração sólida (micélio) foi separada da fração líquida (meio de cultura MF). Da fração líquida foi realizada uma extração em fase sólida. O processo de EFS foi realizado em colunas de fase reversa C₁₈ de 10 g. Após condicionar a coluna com os solventes utilizados no processo, foram aplicados os 250 mL do meio de cultura de uma vez. Em seguida, a coluna foi “lavada” com 50 mL de água para eliminar sais e aminoácidos. Após esta lavagem foi realizado um gradiente de MeOH/H₂O e quatro frações foram obtidas: Fração 1 (**F1**) – 25:75 MeOH/H₂O (50 mL) foi descartada; Fração 2 (**F2**) – 1:1 MeOH/H₂O (50 mL) também descartada; Fração 3 (**F3**) – 75:25 MeOH/H₂O (50 mL) e Fração 4 (**F4**) – 100% de MeOH (50 mL).

Todo este procedimento foi realizado para as duas linhagens de *Penicillium* estudadas.

3.6.1 *P. oxalicum*

Para o cultivo em média escala de *P. oxalicum* foram inoculados 8 frascos Schott de 500 mL de capacidade, contendo 250 mL de meio de cultura cada. Um

destes frascos apresentou contaminação e foi descartado. Portanto, foram obtidos 1750 mL de meio de cultura. Após o processo de filtração do total de 1750 mL de meio de cultura, separação do micélio, extração em fase sólida e evaporação do solvente (todo este processo está citado acima no item 3.6 acima), as massas obtidas para cada uma das frações da EFS foram as seguintes:

F30OT-EFS – Fração 1 (MeOH/H₂O 25:75) – descartada.

F30OT-EFS – fração 2 (MeOH/H₂O 1:1) – descartada.

F30OT-EFS – fração 3 (MeOH/H₂O 75:25) – 27,4 mg, código F30OT-3.

F30OT-EFS – fração 4 (MeOH 100%) – 5,4 mg, código F30OT-4.

3.6.2 *P. citrinum*

Para o cultivo em média escala de *P. citrinum* foram inoculados 8 frascos Schott de 500 mL de capacidade cada, contendo 250 mL de meio de cultura. Após o processo de filtração, separação do micélio do meio de cultura, extração em fase sólida e evaporação do solvente, realizada a partir do crescimento de 2 L de meio de cultura, as massas obtidas para as frações foram:

F53OT-EFS – Fração 1 (MeOH/H₂O 25:75) – descartada.

F53OT-EFS – fração 2 (MeOH/H₂O 1:1) – descartada.

F53OT-EFS – fração 3 (MeOH/H₂O 75:25) – 159,6 mg, código F53OT-3.

F53OT-EFS – fração 4 (MeOH 100%) – 36,9 mg, código F53OT-4.

3.7 Isolamento e purificação dos compostos de *P. oxalicum* e *P. citrinum*

3.7.1 *P. oxalicum*

Após realizar o crescimento em média escala (1750 mL de meio de cultura), o procedimento de filtração em celite e o processo de EFS para o meio de cultura da linhagem de *P. oxalicum*, as frações então obtidas foram submetidas ao processo de purificação por CLAE-UV. As frações 1 e 2 da EFS não foram submetidas ao procedimento de isolamento e purificação em CLAE, pois apresentaram muitos sais e aminoácidos presentes no meio de cultura. Foi obtida uma pequena quantidade de massa (5,4 mg) da fração 4, da EFS. Adicionalmente, esta fração não apresentou nenhum metabólito secundário quando analisada por CLAE-UV. Sendo assim, apenas a Fração 3, F30OT-3 (27,4 mg de massa), da EFS foi submetida ao procedimento de separação e purificação por CLAE-UV.

A separação cromatográfica foi realizada em modo reverso com uma coluna analítica C₁₈ Inertsil ODS-3 (dimensões 250 x 4,6 mm; 5 µm) eluída com os solventes MeOH/H₂O, na proporção de 60:40, durante 30 minutos com fluxo de 1 mL/min.

3.7.2 *P. citrinum*

Após a produção em média escala de 2 L de meio de cultura, seguida do procedimento de filtração em celite e processo de EFS para o meio de cultura da linhagem de *P. citrinum*, as frações obtidas foram submetidas ao processo de purificação em CLAE. Tal como para a linhagem de *P. oxalicum*, as frações 1 e 2 da EFS também não foram submetidas ao procedimento de isolamento e purificação

em CLAE, pelo mesmo motivo. As frações 3 (F53OT-3) e 4 (F53OT-4) da EFS foram submetidas ao procedimento de separação e purificação por CLAE.

A separação cromatográfica das frações F53OT-3 e F53OT-4 foram realizadas por CLAE-UV. O modo de separação foi em fase reversa. Para a purificação da F53OT-3 (159,6 mg), foi utilizada uma coluna semi-preparativa C₁₈ CSC-Inertsil 150A/ODS2 (dimensões 250 x 9,4 mm; 5 µm) eluída com os solventes MeOH/H₂O, na proporção 80:20, por 30 minutos com fluxo de 1 mL/min. Para a purificação da F53OT-4 (36,9 mg), foi utilizada uma coluna analítica C₁₈ Inertsil ODS-3 (dimensões 250 x 4,6 mm; 5 µm) eluída com os solventes MeOH/H₂O na proporção de 70:30, durante 30 minutos com fluxo de 1 mL/min.

3.8 Caracterização e identificação dos compostos isolados

3.8.1 *P. oxalicum*

Os compostos isolados por CLAE obtidos a partir da Fração 3 da EFS (F30OT-3) foram posteriormente analisados em um cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a um detector ultravioleta-visível com arranjo de fotodiodos, também acoplado a um detector de espectrometria de massas (CLAE-UV-EM).

Após analisar os espectros no ultravioleta e de massas então obtidos, as amostras foram recuperadas e enviadas para serem realizadas análises de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN-¹H) e Carbono 13 (RMN-¹³C).

Os espectros foram analisados e com os dados obtidos foi realizada uma busca na literatura com auxílio das bases de dados Scifinder e Dictionary of Natural Products. Desta forma foi possível determinar as estruturas do compostos puros isolados de *P. oxalicum*.

3.8.2 *P. citrinum*

Os compostos isolados por CLAE obtidos das frações F53OT-3 e F53OT-4 da EFS foram posteriormente analisados em um cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a um detector ultravioleta-visível com arranjo de fotodiodos, também acoplado a um detector de espectrometria de massas (CLAE-UV-EM).

Após analisar os espectros no ultravioleta e de massas, as amostras foram recuperadas e enviadas para serem realizadas análises de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN-¹H) e Carbono 13 (RMN-¹³C) e bidimensionais.

Todos os espectros foram analisados e, com os dados obtidos foi realizada uma busca na literatura (bases de dados Scifinder e Dictionary of Natural Products). Estas análises permitiram a identificação das estruturas dos compostos isolados.

Capítulo 4

Resultados e discussão

Capítulo 4 – Resultados e discussões

4.1 Identificação taxonômica das linhagens

A análise taxonômica molecular mostrou uma porcentagem de similaridade (BLAST) para F30 de 99% em relação a espécie *Penicillium oxalicum*, 98% para *Penicillium* sp. e 97% para *Penicillium ochrochloron*. As análises de taxonomia convencional realizadas para a linhagem F30 mostraram características macro e microscópicas semelhantes às encontradas para o fungo filamentoso *Penicillium oxalicum*: colônias medindo 28-30 mm de diâmetro, convolutas ao centro, velutinosas radialmente sulcadas, margens finas 2-4 mm de largura, micélio branco em áreas flocosas, conidiogênese tipicamente forte, conídios de coloração verde oliva, ausência de pigmento solúvel, reverso pálido, conidióforos com estipes medindo 200-400 µm de comprimento, parede lisa, métulas de 16-18 µm de comprimento e fiáldes acerosas de 10-15 µm de comprimento, conídios elipsoidais medindo 4,5-5,5 µm de diâmetro, parede lisa ou levemente rugosa, nascem em longas colunas.

Para F53 as análises de taxonomia molecular mostraram uma similaridade de 99% em relação a espécie de *Penicillium citrinum*. As análises de taxonomia convencional realizadas para a linhagem F53 mostraram características macro e microscópicas semelhantes às encontradas para o fungo filamentoso *Penicillium citrinum*: colônias medindo 25-30 mm de diâmetro, radialmente sulcadas, área marginal velutinosas, centralmente flocosa, margem estreita, micélio branco, exudado claro e abundante, conidiogênese moderada, conídios de coloração verde escuro a turquesa escuro especialmente nas margens da colônia, reverso creme amarelado, conidióforos com estipes medindo 100-300 µm de comprimento, parede lisa, métulas de 12-15 µm de comprimento e fiáldes 7-8 µm de comprimento, conídios esféricos

medindo 2-3 μm de diâmetro com parede levemente rugosa. Com estes resultados taxonômicos, a linhagem cujo código F30 foi identificada como sendo de uma espécie de *Penicillium oxalicum* e a linhagem cujo código F53 foi identificada como sendo de uma espécie de *Penicillium citrinum*.

4.2 Planejamento fatorial fracionário

4.2.1 *P. oxalicum*

Após o período de incubação para cada experimento do PFF (tabela 1, página 32) realizado para *P. oxalicum*, os meios de cultura destes experimentos foram submetidos à filtração e ao procedimento de EFS. Após a evaporação das frações 3 e 4 obtidas, estas foram pesadas. Estes resultados estão dispostos na tabela 5.

Tabela 5 – Massas (em mg) das frações da EFS obtidas a partir dos experimentos de crescimento do PFF realizados em 50 mL de meio de cultura para a espécie de fungo F30 (*Penicillium oxalicum*).

Exp. PFF	Fração 3 da EFS	Fração 4 da EFS
1	1,9	0,1
2	4,6	0,6
3	0,5	0
4	0,2	0
5	3,6	0,3
6	2,1	0,4
7	0,6	0
8	1,5	0,5
9	0,5	0
10	0,2	0
11	0,1	0
12	0,1	0
13	1,3	0,2
14	7,3	0,7
15	0,8	0
16	0,5	0
17	0,9	0,5
18	1,2	0,5
19	1,2	0,3

Como já citado anteriormente, item 3.5 (página 36), as frações 1 e 2 da EFS foram descartadas por apresentar muitos componentes do meio de cultura. Observando os resultados da tabela 5, pode-se verificar que a massa obtida para a fração 3 do experimento 14 foi a que apresentou maior quantidade. A fração 4 da EFS tem os experimentos 2 e 14 do PFF como melhores resultados. Não foi obtida massa da fração 4 da EFS para alguns experimentos. Talvez isso tenha ocorrido pelo fato de *P. oxalicum* produzir metabólitos secundários com polaridade intermediária, e pelo fato desta fração ser a mais apolar. Assim, alguns experimentos não apresentaram uma quantidade significativa de metabólitos secundários.

Todas as frações de cada experimento do PFF (tabela 5) foram diluídas a uma concentração final de 1 mg/mL. Estas foram analisadas por CLAE-UV, monitorado em comprimento de onda de 230 nm. Para cada cromatograma foi realizado o cálculo da integral da área do intervalo de 10 a 26 minutos (conforme figura 2, página 36). As áreas obtidas para os cromatogramas das frações de cada experimento do PFF estão incluídas na tabela 6.

Tabela 6 – Áreas dos cromatogramas obtidos por CLAE-UV para as frações da EFS dos experimentos de crescimento do PFF realizados para *P. oxalicum*. Comprimento de onda utilizado 230 nm.

Exp. PFF	Fração 3 da EFS	Fração 4 da EFS
1	1,157	0,577
2	0,671	0,748
3	0,284	0
4	0,525	0
5	0,566	0,762
6	0,977	0,787
7	0,737	0
8	0,498	0,438
9	0,191	0
10	0,403	0
11	0,180	0
12	0,187	0
13	0,361	0,608
14	0,540	0,565
15	0,509	0
16	1,050	0
17	1,173	0,692
18	1,028	0,614
19	1,087	0,606

Observando os resultados na tabela 6, nota-se que para a fração 3 os experimentos 1, 6 e 16 do PFF e experimentos do ponto central (17, 18 e 19) apresentaram uma área maior que as dos demais experimentos. Para a fração 4 da EFS, os experimentos que foram analisados por CLAE-UV apresentaram áreas muito semelhantes, e não houve um experimento em destaque.

Após a realização dos cálculos da relação área do cromatograma / massa da fração, os resultados foram incluídos na tabela 7. Esta análise foi realizada para se verificar a possibilidade de obter-se frações ricas em metabólitos secundários. Ou seja, um resultado elevado desta relação área/massa indicaria que temos cromatogramas das frações mais “limpos”.

Tabela 7 – Relação área do cromatograma/massa da fração obtidas a partir dos experimentos de crescimento do PFF realizados para *P. oxalicum*. As áreas foram obtidas em comprimento de onda de 230 nm.

Exp. PFF	Fração 3 da EFS	Fração 4 da EFS
1	0,609	1,923
2	0,146	1,247
3	0,568	0
4	0,875	0
5	0,157	1,271
6	0,465	1,968
7	1,229	0
8	0,332	0,876
9	0,381	0
10	1,007	0
11	0,900	0
12	0,935	0
13	0,278	1,520
14	0,074	0,807
15	0,636	0
16	2,101	0
17	1,303	1,385
18	0,857	1,228
19	0,906	1,010

Os resultados apresentados na tabela 7 indicam que no caso da fração 3 da EFS, o experimento que apresentou um melhor resultado foi o 16 (observando na tabela 6, este experimento, dentre outros, também indicou melhor área que os demais). Pelo fato de alguns experimentos não terem fornecido massa suficiente da fração 4 da EFS, o resultado da relação área/massa também foi zero (0). Ainda, com relação a fração 4, pode-se observar nos resultados da tabela 7, que alguns experimentos apresentam uma alta relação área/massa. Bem como os experimentos 1, 6 e 13. Pelo fato de vários experimentos terem fornecido pouca (ou nenhuma) massa da fração 4 da EFS (tabela 5, página 52, abaixo de 1 mg). Pode-se ter um falso resultado na relação área do cromatograma/massa da fração, pois massas muito reduzidas proporcionam um erro de pesagem, e isso influencia diretamente no resultado da relação área/massa.

Após realizar todos os cálculos de interação de 1ª e 2ª ordem das variáveis dos experimentos de crescimento (cálculos explicados nos itens 3.5.1 e 3.5.2) relacionando-os às áreas dos cromatogramas, foram obtidos os resultados da tabela 8.

Tabela 8 – Efeito das interações de 1ª e 2ª ordem obtidos para as áreas dos cromatogramas das Frações da EFS dos experimentos de crescimento do PFF realizados para *P. oxalicum*.

Interações	Fração 3 da EFS	Fração 4 da EFS
Ea	-0,108	-0,074
Eb	0,112	0,451
Ec	-0,205	-0,229
Ed	0,249	0,267
Ee	0,243	-0,068
Eab	0,029	0,036
Eac	0,115	0,031
Ead	0,127	-0,085
Eae	-0,022	0,173
Ebc	0,200	-0,120
Ebd	0,220	0,158
Ebe	-0,011	0,042
Ecd	0,170	0,064
Ece	-0,010	0,025
Ede	0,101	-0,078

Os gráficos de probabilidade foram construídos com os resultados dos efeitos das interações de 1ª e 2ª ordem observados entre os parâmetros experimentais e as respectivas áreas dos cromatogramas medidas para as frações 3 e 4 de todos os meios de cultura de cada experimento de crescimento. Os resultados são apresentados nas figuras 4 e 5. O procedimento utilizado para a análise destes gráficos está descrito no item 3.5.3 da parte experimental.

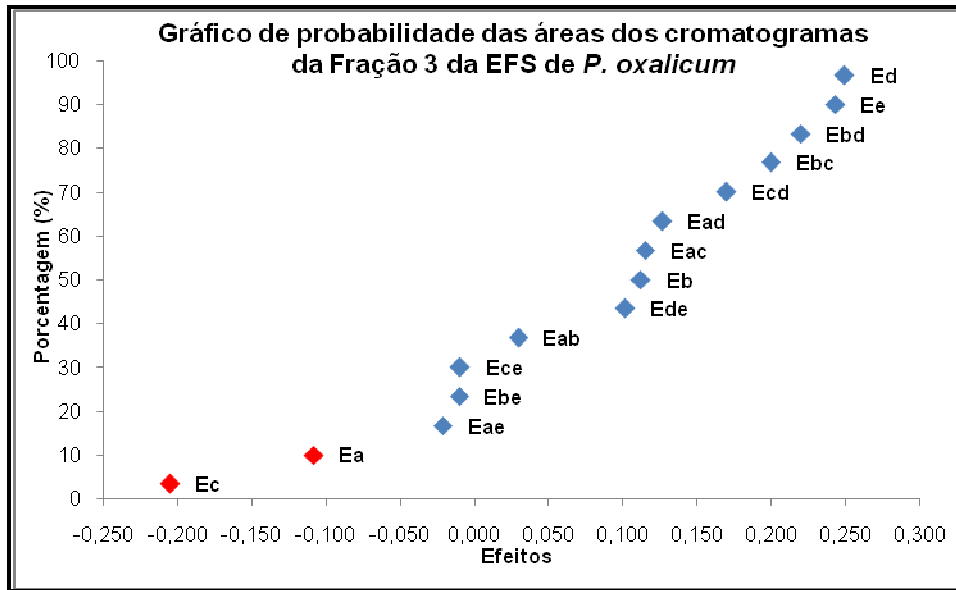


Figura 4 – Gráfico de probabilidade obtido a partir dos efeitos de 1ª e 2ª ordem dos cálculos efetuados para áreas dos cromatogramas da fração 3 da EFS dos experimentos de crescimento do PFF realizados para *P. oxalicum*. Destacados em vermelho estão os efeitos significativos.

Analisando-se o gráfico de probabilidades para as áreas dos cromatogramas da fração 3 da EFS obtidas a partir dos experimentos de crescimento de *P. oxalicum*, pode-se verificar que dois efeitos se apresentaram isolados dos demais (distantes dos outros efeitos): **Ea**, efeito da [sais], e **Ec**, efeito do tempo de incubação. Assim, a medida da área dos cromatogramas das frações F3 dos experimentos de crescimento de *P. oxalicum* indicaram que as variáveis [sais] e tempo foram significativas para uma maior produção de metabólitos secundários. Ainda analisando-se o gráfico da figura 4, pode-se observar que os valores para Ea e Ec são ambos negativos. Portanto estas duas variáveis devem ser utilizadas em seus níveis mais baixos (-), ou seja, 20% da concentração total de sais e 14 dias de incubação, para que ocorra um aumento na produção de metabólitos secundários de *P. oxalicum*.

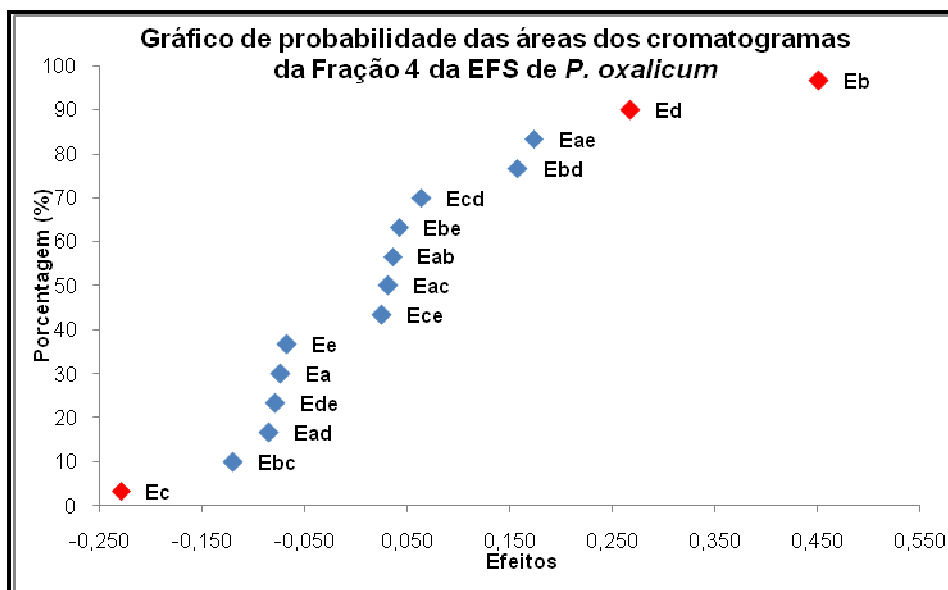


Figura 5 – Gráfico de probabilidade obtido a partir dos efeitos de 1ª e 2ª ordem dos cálculos efetuados para áreas dos cromatogramas da fração 4 da EFS dos experimentos de crescimento do PFF realizados para *P. oxalicum*. Destacados em vermelho estão os efeitos significativos.

Analisando-se o gráfico de probabilidades para as áreas dos cromatogramas obtidos para a fração da fração 4 dos experimentos de crescimento de *P. oxalicum*, observa-se que três efeitos se apresentaram isolados dos demais: **Ec** (efeito do tempo de incubação) **Eb** (efeito da [nutrientes]) e **Ed** (efeito do pH inicial). Portanto, as variáveis [nutrientes], tempo de incubação e pH inicial foram significativas para uma maior produção de metabólitos secundários da fração 4. O gráfico da figura 5, indica que o valor para Ec foi negativo; portanto esta variável deve ser utilizada em seu nível mais baixo (-), ou seja, 14 dias de incubação. Pode-se igualmente observar que os valores para Eb e Ed foram ambos positivos, portanto estas duas variáveis devem ser utilizadas em seus níveis mais elevados, ou seja, 60% da concentração total de nutrientes e pH inicial 8.

Os resultados obtidos das análises destes 2 gráficos de probabilidades (figuras 4 e 5) indicaram que o incremento na produção de metabólitos secundários por *P. oxalicum* pode ser assim resumido:

- No caso do incremento da **Fração 3** – duas variáveis são significativas **[sais]** (20% da concentração total de sais) e **tempo de incubação** (14 dias de incubação).
- No caso do incremento da **Fração 4** – três variáveis são significativas **[nutrientes]** (60% da concentração total de nutrientes), **tempo de incubação** (14 dias de incubação); e, **pH inicial** (pH 8).

Portanto, levando-se em conta estes resultados, deve-se utilizar uma condição para que a linhagem de *P. oxalicum* venha a produzir uma maior quantidade de metabólitos secundários, com a seguinte condição: 20% da concentração total de sais, 60% da concentração total de nutrientes, 14 dias de incubação, pH inicial 8 e temperatura de 30°C. Esta condição, obtida através das análises das áreas dos cromatogramas, foi nomeada de **F30OT-1**.

Também foram realizados os cálculos de interação de 1ª e 2ª ordem das variáveis levando-se em conta a relação área do cromatograma / massa das frações 3 e 4 obtidas de cada experimento de crescimento de *P. oxalicum*. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 9.

Tabela 9 – Efeito das interações de 1ª e 2ª ordem calculados para a relação área do cromatograma/massa da fração da EFS obtidos a partir dos experimentos de crescimento do PFF realizados para da linhagem de *P. oxalicum*.

Interações	Fração 3 da EFS	Fração 4 da EFS
Ea	-0,147	-0,023
Eb	-0,557	0,983
Ec	0,019	-0,409
Ed	-0,241	0,620
Ee	0,529	0,151
Eab	0,080	0,196
Eac	0,021	0,192
Ead	0,333	-0,201
Eae	-0,211	0,392
Ebc	0,274	-0,190
Ebd	0,151	0,401
Ebe	-0,129	0,370
Ecd	-0,015	0,173
Ece	-0,189	0,018
Ede	-0,036	-0,027

Os gráficos de probabilidade que ilustram as interações de 1ª e 2ª ordem das variáveis de crescimento relacionados à relação área/massa também foram construídos (figuras 6 e 7).

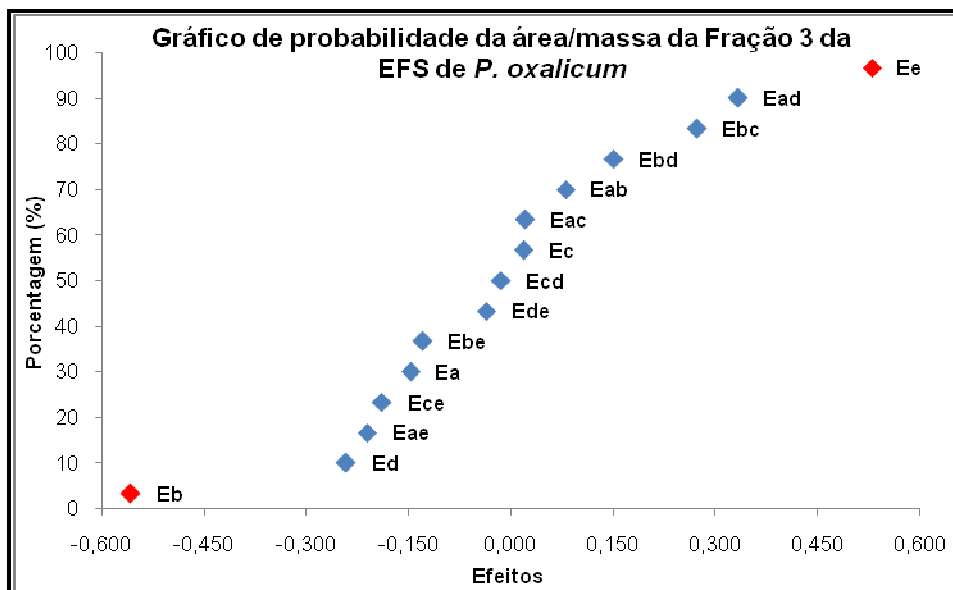


Figura 6 – Gráfico de probabilidade obtido a partir dos efeitos de 1ª e 2ª ordem dos cálculos efetuados para a relação área/massa da fração 3 da EFS dos experimentos de crescimento do PFF realizados para *P. oxalicum*. Destacados em vermelho estão os efeitos significativos.

Analisando-se o gráfico de probabilidades para a relação área/massa da fração 3 (figura 6) pode-se verificar que dois efeitos se apresentaram isolados dos demais: **Eb** (efeito da [nutrientes]) e **Ee** (efeito da temperatura de incubação). Portanto, com base nos resultados da relação área/massa obtidos para a fração 3 da EFS de *P. oxalicum*, as variáveis [nutrientes] e temperatura foram significativas para uma maior produção de metabólitos secundários. Ainda analisando-se o gráfico da figura 6, pode-se observar que o valor para **Eb** foi negativo e para **Ee** foi positivo. Portanto a variável [nutrientes] deve ser utilizada em seu nível mais baixo (-), ou seja, 20% da concentração total de nutrientes, e a variável temperatura deve ser utilizada em seu nível mais elevado (+), ou seja, 30°C como temperatura de incubação.

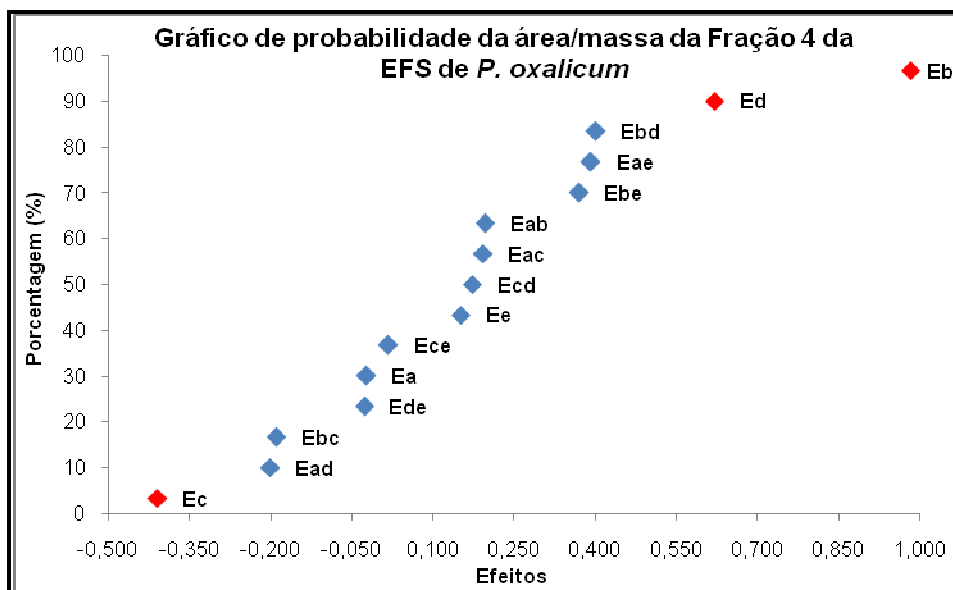


Figura 7 – Gráfico de probabilidade obtido a partir dos efeitos de 1ª e 2ª ordem dos cálculos efetuados para a relação área/massa da fração 4 da EFS dos experimentos de crescimento do PFF realizados para *P. oxalicum*. Destacados em vermelho estão os efeitos significativos.

Analisando o gráfico de probabilidades para a relação área/massa da fração 4 da EFS de cada experimento de crescimento de *P. oxalicum* (figura 7), pode-se verificar que três efeitos se apresentam isolados dos demais: **Ec** (efeito do tempo de

incubação), **Ed** (efeito do pH inicial) e **Eb** (efeito da [nutrientes]). Portanto, com base no resultados da relação área/massa obtidos para a fração 4 da EFS de *P. oxalicum*, as variáveis [nutrientes], pH inicial e temperatura de incubação foram significativas para uma maior produção de metabólitos secundários. No gráfico da figura 7, observa-se que o valor para **Ec** foi negativo e para **Ed** e **Eb** foram ambos positivos. Portanto, a variável tempo deve ser utilizada em seu nível mais baixo (-), ou seja, 14 dias de incubação, a variável pH inicial deve ser utilizada em seu nível mais elevado (+), ou seja, pH 8, e a variável [nutrientes] deve ser utilizada em seu nível mais elevado (+), ou seja, 60% da concentração de nutrientes.

Os resultados obtidos nas análises destes 2 gráficos de probabilidades (figuras 6 e 7), indicaram que duas condições para uma maior produção de metabólitos secundários por *P. oxalicum* podem ser:

- No caso do incremento da **Fração 3** – duas variáveis significativas **[nutrientes]** (10% da concentração total de nutrientes) e **temperatura de incubação** (30°C).
- No caso do incremento da **Fração 4** – três variáveis significativas **tempo de incubação** (14 dias), **pH inicial** (pH 8) e **[nutrientes]** (60% da concentração do total de nutrientes).

Portanto, levando-se em conta estes resultados, deve-se utilizar duas condições distintas, com as seguintes condições de crescimento:

1ª condição – 20% da concentração total de sais, 60% da concentração total de nutrientes, 14 dias de incubação, pH inicial 8 e temperatura de 30°C. Esta condição, obtida através da análise das interações de 1ª e 2ª ordem com a relação área/massa, foi idêntica a condição encontrada para esta mesma análise

relacionada às áreas do cromatograma (resultados logo acima página 59) anteriormente denominada **F30OT-1**.

2ª condição – 20% da concentração total de sais, 10% da concentração total de nutrientes, 14 dias de incubação, pH inicial 8 e temperatura de 30°C. Esta condição foi nomeada de **F30OT-2**.

Através das análises das interações de 1ª e 2ª para as áreas e relação área/massa das frações 3 e 4 da EFS de *P. oxalicum*, foram estabelecidas duas condições ótimas de crescimento (tabela 10).

Tabela 10 – Condições ótimas estabelecidas através de análises multivariadas para uma maior produção de metabólitos secundários por *P. oxalicum*.

Experimentos	Parâmetros de crescimento				
	[sais]	[nutrientes]	tempo (dias)	pH inicial	temperatura (°C)
Controle (sem alteração F30-C)	100%	100%	7	5.8	25
F30OT-1	20%	60%	14	8	30
F30OT-2	20%	10%	14	8	30

Com as duas condições ótimas de crescimento encontradas para *P. oxalicum*, foram realizados experimentos em replicatas para verificar qual das duas condições (F30OT-1 ou F30OT-2) levariam a uma maior produção de metabólitos secundários. Paralelamente, foram realizados experimentos de crescimento de acordo com os parâmetros utilizados para o cultivo em meio de cultura MF sem alteração. Ou seja, 100% da concentração total de sais; 100% da concentração total de nutrientes; 14 dias de incubação; pH inicial 5,8 e temperatura ambiente. Este experimento foi nomeado de controle (F30-C).

Os procedimentos de contagem de esporos, quantidade de meio de cultura utilizado, preparação do inóculo, filtração, EFS e CLAE, foram os mesmos utilizados para os experimentos do PFF descritos no item 3.5 (Esquema 1, página 37).

Após realizar, em replicatas, os experimentos F30OT-1, F30OT-2 e F30-C, conforme as condições indicadas para cada um, cada fração foi analisada e as massas encontradas para as frações F3 e F4 da EFS de cada experimento estão dispostas na tabela 11.

Tabela 11 – Massas (em mg) obtidas para as frações 3 e 4 da EFS a partir dos experimentos ótimos de crescimento realizados para *P. oxalicum* (F30).

Experimento	Fração 3 da EFS	Fração 4 da EFS
F30OT-1.1	2,8	0,9
F30OT-1.2	2,1	0,6
F30OT-1.3	1,8	0,3
F30OT-1.4	2,3	0,8
F30OT-1.5	2,7	0,3
F30OT-2.1	1,5	0,7
F30OT-2.2	1,2	1,0
F30OT-2.3	0,8	0,5
F30OT-2.4	1,1	0,5
F30OT-2.5	1,1	0,5
F30-C.1	4,3	0,6
F30-C.2	4,5	0,5
F30-C.3	5,8	1,0

Observando-se os resultados obtidos para os experimentos ótimos realizados para *P. oxalicum*, verificou-se que os experimentos realizados como controle (F30-C.1 a C.3) foram os que apresentaram melhor resultado para as massas das frações da EFS.

Cada fração de cada experimento ótimo e controle foi diluída à concentração de 1 mg/mL e analisada por CLAE-UV, cada cromatograma foi tratado, e suas áreas foram obtidas conforme figura 2 (página 36). Os resultados destas áreas estão na tabela 12.

Tabela 12 – Áreas dos cromatogramas obtidas para as frações 3 e 4 da EFS a partir dos experimentos ótimos de crescimento realizados para *P. oxalicum* (F30). Cromatogramas obtidos em comprimento de onda de 230 nm.

Experimento	Fração 3 da EFS	Fração 4 da EFS
F30OT-1.1	0,743	0,519
F30OT-1.2	0,718	0,657
F30OT-1.3	0,816	0,158
F30OT-1.4	0,603	0,945
F30OT-1.5	0,894	0,134
F30OT-2.1	0,480	0,305
F30OT-2.2	0,464	0,286
F30OT-2.3	0,617	0,400
F30OT-2.4	0,434	0,364
F30OT-2.5	0,432	0,376
F30-C.1	0,755	0,688
F30-C.2	0,702	0,608
F30-C.3	0,698	1,186

Observando os resultados apresentados na tabela 11, nota-se que para a fração 4 da EFS, os experimentos utilizados como controle (F30-C.1 a C.3) apresentaram melhores resultados que os experimentos ótimos. No entanto, para a fração 3 os experimentos ótimos 1 (F30OT-1.1 a 1.5) apresentaram resultado ligeiramente melhor. Os resultados da relação área/massa para os experimentos ótimos realizados para *P. oxalicum* estão dispostos na tabela 13.

Tabela 13 – Relação área/massa obtidas para as frações 3 e 4 da EFS a partir dos experimentos ótimos de crescimento realizados para *P. oxalicum* (F30).

Experimento	Fração 3 da EFS	Fração 4 da EFS
F30OT-1.1	0,265	0,577
F30OT-1.2	0,342	1,095
F30OT-1.3	0,453	0,527
F30OT-1.4	0,262	1,181
F30OT-1.5	0,331	0,447
F30OT-2.1	0,320	0,436
F30OT-2.2	0,387	0,286
F30OT-2.3	0,771	0,800
F30OT-2.4	0,395	0,728
F30OT-2.5	0,393	0,752
F30-C.1	0,176	1,147
F30-C.2	0,156	1,216
F30-C.3	0,120	1,186

Observando-se os resultados para relação área/massa (tabela 13) pode-se verificar que para a fração 3 da EFS os dois experimentos ótimos testados apresentaram resultados muito parecidos. Estes foram melhores que os obtidos para o controle (F30-C.1 a C.3). Para a fração 4, os experimentos controle (F30-C.1 a C.3) apresentaram melhor resultado.

Para melhor visualização dos resultados de otimização realizados para *P. oxalicum*, a seguir estão representados alguns cromatogramas (figura 8) de experimentos do PFF dos experimentos ótimos (F30OT-1 e 2) e do controle (F30-C) obtidos para a fração 3 da EFS.

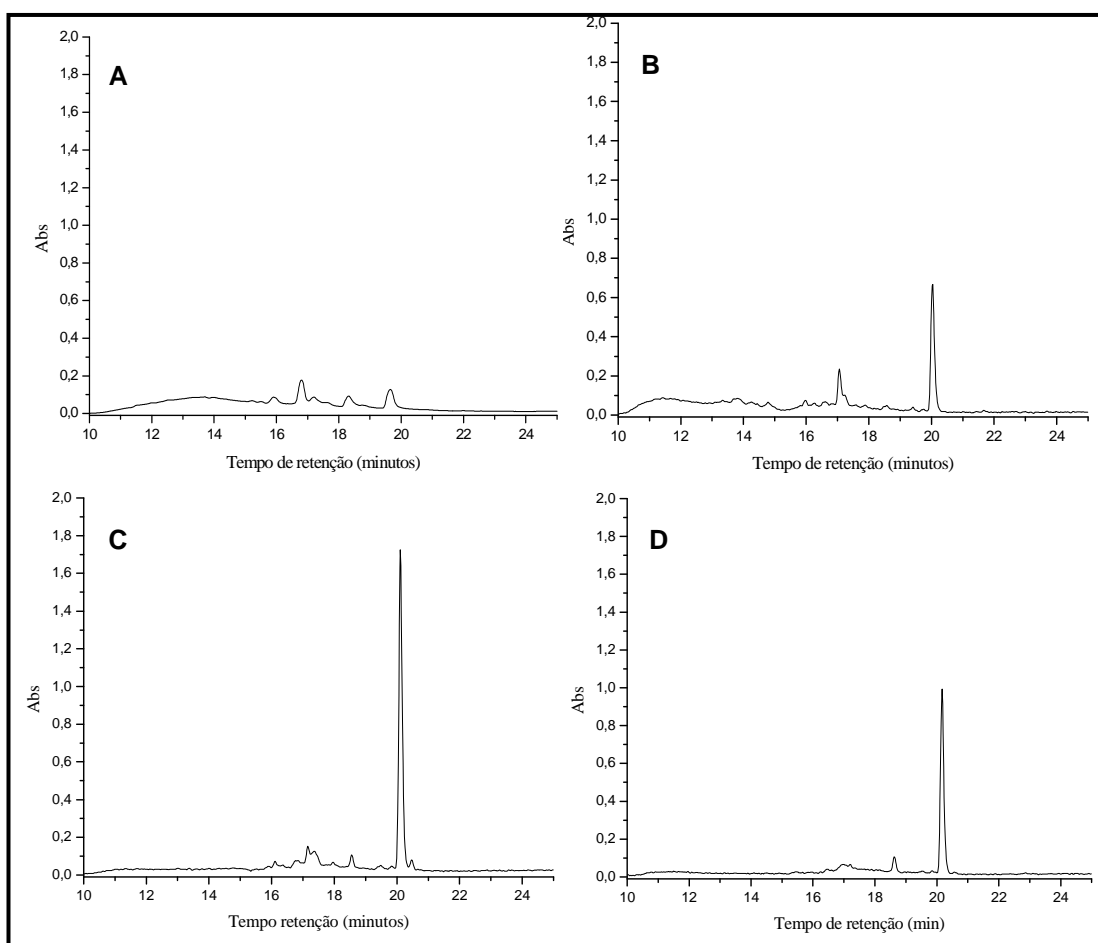


Figura 8 – Cromatogramas de frações 3 da EFS obtidas por CLAE-UV para diferentes experimentos de crescimento da linhagem *P. oxalicum*. Condições experimentais: coluna de fase reversa C₁₈ Synergi Fusion-RP 80 da marca Phenomenex®, de dimensões 250 x 4,6 mm com 4µm de tamanho de partícula com um gradiente metanol-água por 40 minutos, monitorados em comprimento de onda de 230nm. **A**) experimento 2 do PFF; **B**) experimento controle (F30-C-1 a C.3); **C**) experimento ótimo 1 (F30OT-1.1 a 1.5); **D**) experimento ótimo 2 (F30OT-2.1 a 2.5).

Observando-se os cromatogramas da figura 8 pode-se verificar que o experimento ótimo F30OT-1 (Figura 8C) nitidamente apresenta um melhor resultado que os demais. No entanto, este resultado não foi tão acentuado quando se leva em conta a massa desta fração, ou a área do cromatograma, ou ainda a relação área massa para a fração 3 da EFS (tabelas 11, 12 e 13, respectivamente). Porque isso ocorreu? Observando-se atentamente para a linha de base dos cromatogramas dos experimentos 2 do PFF e F30-C (figuras 8A e B, respectivamente), notamos que estes cromatogramas apresentam no início da eluição algumas imperfeições na linha de base. Estas podem ser devido a presença de componentes do meio de cultura, tais como nutrientes. Estes componentes do meio de cultura interferem diretamente nos resultados apresentados nas tabelas 11, 12 e 13, pois se existem interferentes estes influenciam, principalmente, nos resultados das medidas das áreas do cromatogramas e também na relação área/massa. Isso porque a área do cromatograma sofre pouca alteração (pois os interferentes absorvem pouco), porém a massa da fração correspondente aumentou significativamente. Este é o motivo pelo qual os resultados encontrados para as massas e áreas do cromatograma (tabelas 11 e 12, respectivamente), são melhores para o controle (experimento F30-C), e os resultados apresentados para a relação área/massa (tabela 13) foi melhor para os experimentos ótimos testados (F30OT-1 e 2). Quando se considera a relação área/massa, observa-se cromatogramas mais “limpos”, ou seja, com maior diversidade de metabólitos secundários e menos interferentes (componentes do meio de cultura ou metabólitos primários).

Analisando-se tais cromatogramas (figura 8) observa-se que a diversidade de metabólitos secundários é muito pequena, com no máximo 3 diferentes compostos com diferentes tempos de retenção (t_R): a) um primeiro com $t_R = 17,1$; b) um

segundo com $t_R = 18,8$ e c) um terceiro com $t_R = 20,1$ minutos. O pico do composto com $t_R = 17,1$ minutos apresentou maior intensidade quando foi utilizado o experimento F30-C (figura 8B). O pico do composto com $t_R = 18,8$ minutos apresentou maior intensidade quando foi utilizado os experimentos ótimos F30OT-1 e 2 (figuras 8C e 8D, respectivamente). Finalmente, o composto com $t_R = 20,1$ minutos apresentou um melhor resultado quando utilizado o experimento ótimo F30OT-1 (figura 8C).

Portanto, por apresentar maior diversidade de metabólitos, as condições de crescimento utilizadas para o experimento F30OT-1 foram escolhidas para se realizar o crescimento de *P. oxalicum* em maior volume, com a finalidade de se obter material suficiente para o isolamento e identificação dos compostos produzidos pela espécie de *P. oxalicum*.

4.2.2 Isolamento, purificação, caracterização e identificação dos compostos obtidos de *P. oxalicum*

O procedimento de cultivo em média escala (1750 mL, item 3.6.1) e purificação por CLAE-UV (item 3.7.1) foram utilizados para se isolar os compostos produzidos por *P. oxalicum* em meio de cultura. Este meio de cultura foi preparado utilizando as condições encontradas através das análises multivariadas, e foram as seguintes: 20% da concentração total de sais; 60% da concentração total de nutrientes; 14 dias de incubação; pH inicial 8 e temperatura de incubação de 30°C (nomeado de experimento ótimo **F30OT**).

Após a realização da filtração em celite e EFS de 1750 mL de meio de cultura, as massas das 4 frações da EFS obtidas foram as seguintes:

F30OT-EFS – Fração 1 (MeOH/H₂O 25:75) – descartada.

F30OT-EFS – fração 2 (MeOH/H₂O 1:1) – descartada.

F30OT-EFS – fração 3 (MeOH/H₂O 75:25) – 27,4 mg, código F30OT-3.

F30OT-EFS – fração 4 (MeOH 100%) – 5,4 mg, código F30OT-4.

As frações 1 e 2 foram descartadas por apresentarem componentes do meio de cultura. A fração 3 da EFS (massa = 27,4 mg) foi submetida a uma purificação por CLAE-UV. Esta apresentou o seguinte perfil cromatográfico (figura 9).

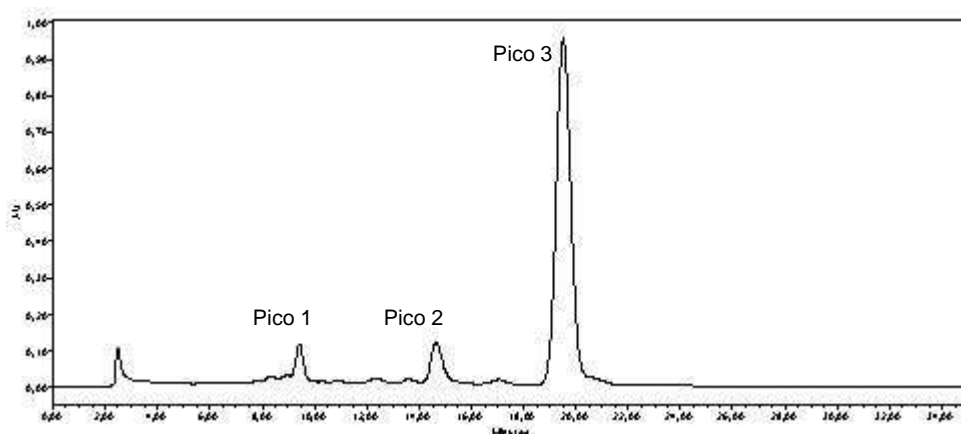


Figura 9 – Cromatograma obtido para a purificação da fração 3 (MeOH/H₂O 75:25) obtida da EFS a partir do crescimento em 1750 mL de meio de cultura de *P. oxalicum* (F30). Condições de análise feita em coluna analítica C₁₈ Inertsil ODS-3 (dimensões 250 x 4,6 mm; 5 µm) eluída com MeOH/H₂O 60:40 por 30 minutos com fluxo de 1 mL/min, monitorada em $\lambda = 230$ nm.

Após a separação e coleta dos compostos referentes aos picos 1, 2 e 3 do cromatograma apresentado na figura 9, estas frações foram evaporadas. As massas obtidas para cada um dos compostos foram as seguintes:

Pico 1 – 4,9 mg (amostra 1), código F30OT-3-P1.

Pico 2 – 3,6 mg (amostra 2), código F30OT-3-P2.

Pico 3 – 5,9 mg (amostra 3), código F30OT-3-P3.

A soma das massas destas 3 amostras totaliza 14,4 mg. Observando-se que a massa da fração 3 da EFS foi de 27,4 mg, obteve-se um rendimento desta separação de 52,6%. Isso indica que, apesar de termos realizado a EFS com 4 diferentes composições da mistura de solventes MeOH/H₂O as frações coletadas devem apresentar componentes mais apolares. Ou a ocorrência de compostos que não absorvem na região do UV e, assim, não foram coletados. Isso explicaria o baixo rendimento obtido nesta separação.

Após evaporadas, as 3 amostras obtidas na cromatografia da Fração 3 de EFS (**F300T-3**) foram posteriormente analisadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a um detector UV-Visível com arranjo de fotodiodos, também acoplado a um detector de espectrometria de massas (CLAE-UV-EM). Foram obtidos os seguintes resultados.

Amostra 1 – **F300T-3-P1**

Esta amostra foi analisada por CLAE-UV-EM e apresentou baixo grau de pureza, necessitando ser repurificada. Os espectros de massas e da região do ultravioleta obtidos estão incluídos na figura 10.

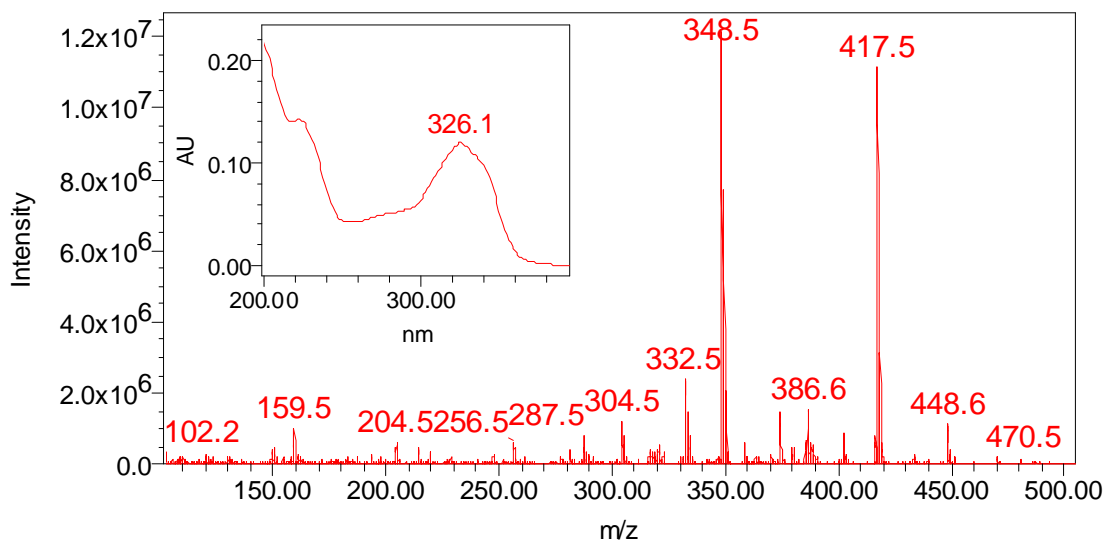


Figura 10 – Espectros de absorção na região do UV e de massas obtidos para a amostra **F30OT-3-P1** de *P. oxalicum*. Condições de ionização: ionização por spray de elétrons em modo positivo (ISE⁺) e cone com voltagem de 25 V.

O espectro de absorbância na região do UV da amostra 1 (figura 10) apresentou duas bandas de absorções mais intensas, em 226 e 326 nm, e uma banda de menor intensidade, em aproximadamente 280 nm. Foi feita uma análise detalhada dos fragmentos do espectro de massas obtido para a amostra F30OT-3-P1 (figura 10). Observou-se que o íon com m/z 448 pode ser considerado como o pico do íon quasi-molecular que corresponde a $[M + H]^+$. Através de uma pesquisa detalhada na literatura foi encontrada a **oxalina**, com perfil químico semelhante ao encontrado para a amostra 3. A oxalina (**26**) possui 447 u.m.a., absorções na região do UV, de maior intensidade, em 228 e 328 nm, uma banda de absorção de menor intensidade (ombro) em 280 nm, aproximadamente, e apresenta massa do íon quase-molecular m/z 448 e um fragmento de massas m/z 417. Estes dados foram encontrados em artigo publicado em 2003, por NIELSEN e SMEDSGAARD. Neste trabalho os autores citam as absorbâncias no ultravioleta, massas e íons moleculares e alguns fragmentos de 474 diferentes compostos analisados por CLAE-UV-EM. A estrutura para este composto não foi identificada, pois apresentou

algumas impurezas e a sua repurificação seria inviável já que foi obtida 4.9 mg desta fração. No entanto, foi observada na amostra F30OT-3-P3 (figura 12) um composto com características físico-químicas semelhantes das observadas para a amostra F30OT-3-P1. Este composto (obtido a partir da fração F30OT-3-P3) foi identificado como sendo a oxalina. Pelo fato das duas amostras possuírem tempos de retenção distintos, pode-se supor que F30OT-3-P1 ($t_R = 9,5$ minutos) é um possível isômero da oxalina (amostra F30OT-3-P3 com $t_R = 19,5$ minutos), mas tal hipótese não pôde ser confirmada.

Amostra 2 – F30OT-3-P2

Esta amostra foi analisada por CLAE-UV-EM e apresentou razoável grau de pureza. Os espectros de massas e da região do ultravioleta obtidos são apresentados na figura 11.

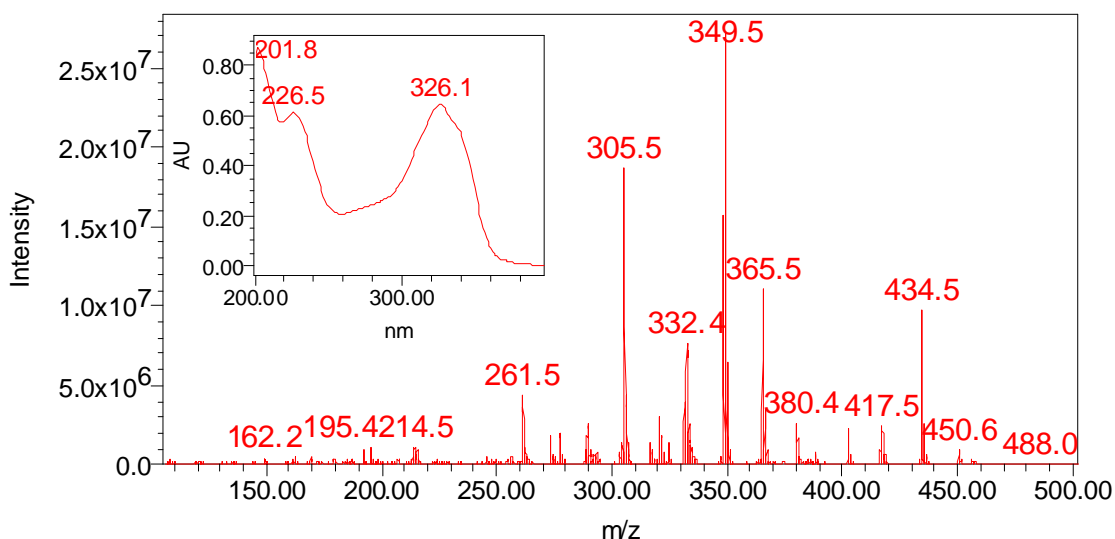
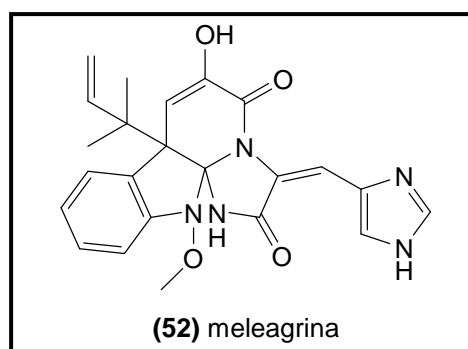


Figura 11 – Espectros de absorção na região do UV e de massas obtidos para a amostra **F30OT-3-P2** de *P. oxalicum*. Condições de ionização: ionização por spray de elétrons em modo positivo (ISE⁺) e cone com voltagem de 25 V.

O espectro de absorção na região do UV da amostra 2 (figura 11) apresentou duas bandas de absorções mais intensas, em 226 e 326 nm, e uma banda de menor intensidade, em 280 nm aproximadamente. Observou-se também que este espectro

foi semelhante ao obtido para amostra 1 (figura 10). Foi realizada uma análise detalhada dos fragmentos do espectro de massas da amostra F30OT-3-P2 (figura 11). Observou-se que o íon com m/z 434 pode ser considerado como o pico do íon quasi-molecular, que corresponde a $[M + H]^+$. Através de uma pesquisa detalhada na literatura foram encontrados dois compostos, a **neoxalina** e a **meleagrina**, com perfis químicos semelhantes aos observados nos espectros de absorção na região do UV e de massas (figura 11) para a amostra 2. Estes dados foram, também, encontrados no artigo publicado em 2003 por NIELSEN e SMEDSGAARD. A neoxalina (**27**) possui 435 u.m.a. e duas bandas de absorções na região do UV em 237 e 330 nm (HIRANO, et al., 1979). A meleagrina (**52**) (isolada por KAWAI, et al., 1983) possui 433 u.m.a., duas bandas de absorções na região do UV, de maior intensidade, em 228 e 328 nm, e um “ombro” (banda de absorção na região do UV de menor intensidade) em 284 nm, e apresenta massa do íon quase-molecular m/z 434 e um fragmento de massas m/z 403.



Amostra 3 – F30OT-3-P3

Esta amostra foi analisada por CLAE-UV-EM e apresentou bom grau de pureza. Os espectros de massas e da região do ultravioleta obtidos, estão dispostos na figura 12.

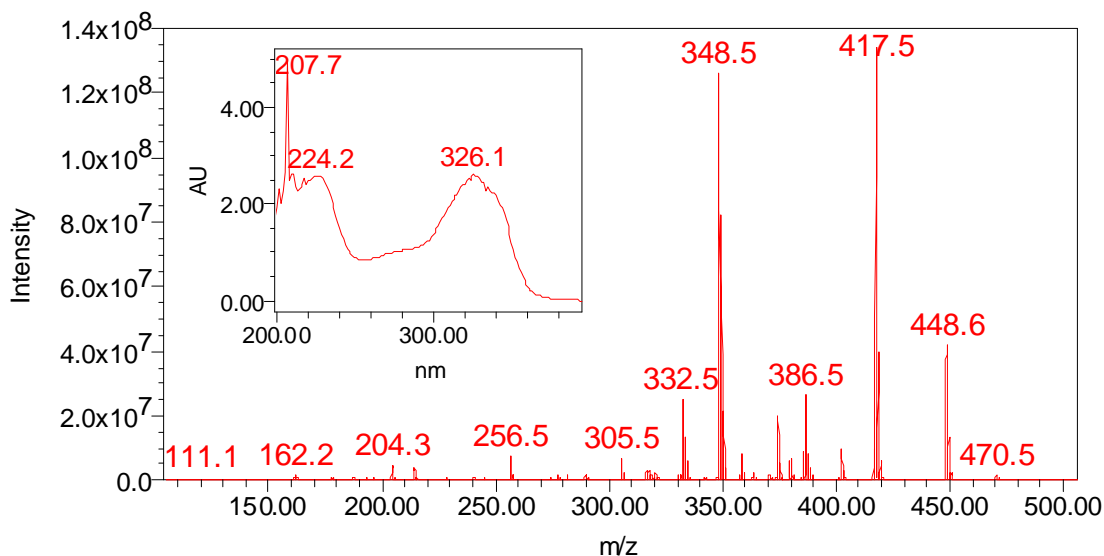


Figura 12 – Espectros de absorção na região do UV e de massas obtidos para a amostra **F30OT-3-P3** de *P. oxalicum*. Condições de ionização: ionização por spray de elétrons em modo positivo (ISE⁺) e cone com voltagem de 25 V.

O espectro de absorvância na região do UV da amostra 3 (figura 12) apresentou duas bandas de absorção mais intensas, em 224 e 326 nm, e uma banda de menor intensidade (ombro) em 280 nm aproximadamente. Este espectro de absorvância na região do UV se apresentou muito parecido com os obtidos para as amostras F30OT-3-P1 e F30OT-3-P2 (figuras 10 e 11, respectivamente), com uma ligeira diferença para a banda de absorção observada em 224 nm (para amostras 1 e 2 esta banda foi detectada em 226 nm). Ao se analisar os fragmentos do espectro de massas obtido para a amostra F30OT-3-P3 (figura 12), observou-se que este é semelhante ao espectro de massas encontrado para a amostra 2 (figura 11), apresentando apenas algumas diferenças. Observou-se que o íon em m/z 448 pode ser considerado como o pico do íon quasi-molecular, que corresponde a $[M + H]^+$.

Para confirmar as estruturas destas 3 amostras (F30OT-3-P1, P2 e P3), estas foram submetidas a análises por RMN-¹H.

Os resultados das análises, por RMN-¹H indicaram que a amostra 1 (Figura v2-3, página 3 do volume 2) realmente não apresenta um grau de pureza suficiente para identificarmos sua estrutura. Mas, possivelmente este composto é um isômero da oxalina.

As análises do espectro de RMN-¹H para a amostra 2 (Figura v2-4, página 4 do volume 2), e com os dados dos espectros de absorvância na região do UV e de massas (figura 11), a estrutura química para a amostra 2 foi identificada como sendo a do composto conhecido por meleagrina (**52**). Esta substância foi, inicialmente, isolada de *Penicillium meleagrinum* e identificada em 1984 por KAWAI e colaboradores (1984).

Tendo confirmado a estrutura deste composto com sendo a meleagrina, e com base no espectro de massas obtido, foi realizada a seguinte proposta para fragmentação desta substância (figura 13).

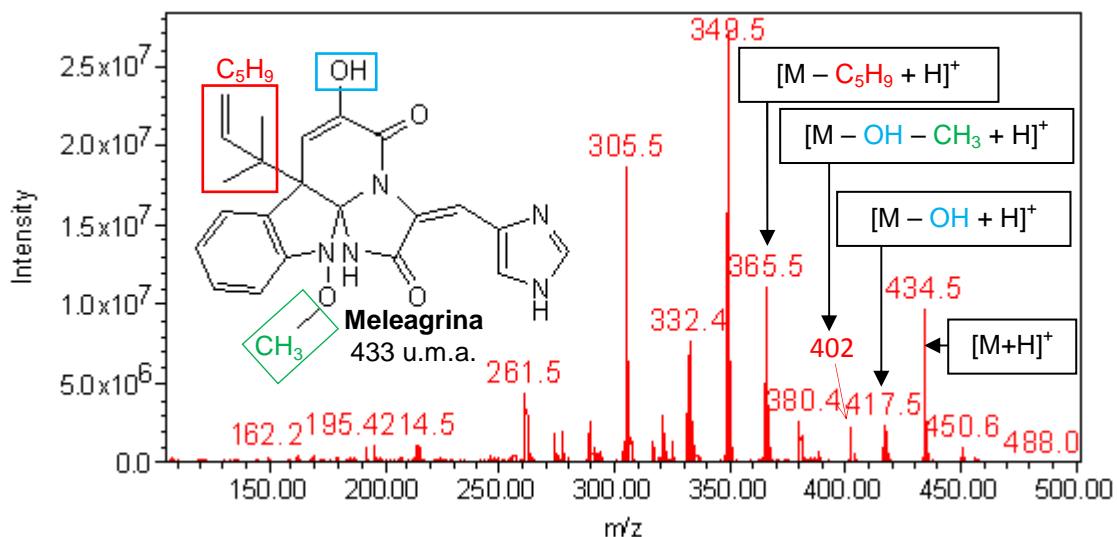
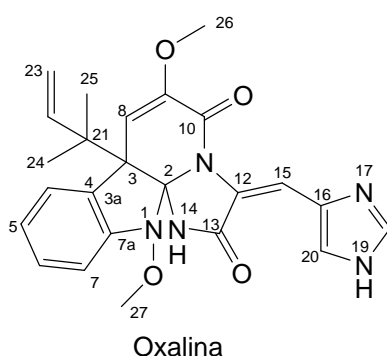


Figura 13 – Proposta de fragmentação para a meleagrina através da ionização por SE⁺.

As análises dos espectros de RMN-¹H e ¹³C (respectivamente, Figuras v2-5 e v2-6, páginas 5 e 6 do volume 2) obtidos para a amostra 3, e os dados obtidos nos

espectros de absorvância na região do UV e de massas (figura 12), permitiram estabelecer a estrutura química do composto da amostra F30OT-3-P3, identificada como sendo a oxalina (**26**) (NAGEL, et al., 1976). Esta substância é conhecida por possuir uma potente ação antitumoral.



A análise do espectro de RMN-¹³C mostrou que este composto possui deslocamentos químicos (δ em ppm) muito semelhantes aos observados para a oxalina (NAGEL, et. al., 1974). Dentre estes, pode-se citar: dois grupos carbonila em δ 164,95 (C-13) e 156,78 (C-11); dois grupos metoxilas em δ 64,66 (C-27) e 55,42 (C-26) e duas metilas em δ 24,10 (C-24) e 23,10 (C-25). A análise do espectro de RMN-¹H também indicou deslocamentos químicos (δ em ppm) que comprovam que o composto isolado é a oxalina. Pode-se citar, dentre estes: hidrogênios aromáticos em δ 7,60 (H-4), 7,29 (H-6), 7,07 (H-5) e 6,98 (H-7); hidrogênios de metoxilas em δ 3,66 (H-27) e 3,54 (H-26) e hidrogênios de dois grupos metilas em δ 1,23 (H-24 e 25).

Com estes resultados foi possível identificar a amostra F30OT-3-P3 como sendo a oxalina. Os resultados obtidos no espectro de massas sugerem a seguinte fragmentação para esta substância (figura 14).

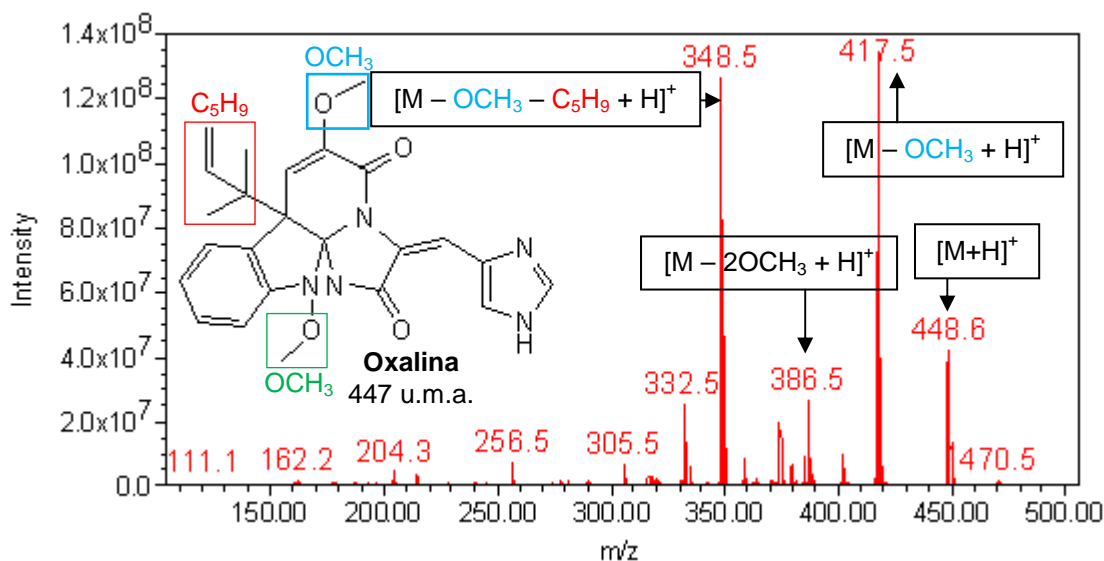


Figura 14 – Proposta de fragmentação para a oxalina através da ionização por SE^+ .

Ao analisar os resultados obtidos na otimização da produção de metabólitos secundários por *P. oxalicum*, verificou-se que a oxalina foi produzida em maior quantidade utilizando-se as condições ótimas (figura 8, pico com $t_R = 20,1$ minutos). Sendo assim, foram realizados cálculos das áreas do pico da oxalina com o intuito de verificar o incremento na produção deste composto. No experimento realizado sem alteração da composição do meio de cultura (F30-C) a área encontrada para o pico da oxalina foi **0,110**. O experimento otimizado F30OT-1 (utilizado para realizar a produção em média escala, 2 L de meio de cultura) apresentou área **0,280** para o pico da oxalina. Portanto, além desta otimização proporcionar a maior produção de metabólitos secundários, também, foi responsável por um incremento de **155%** na produção da oxalina.

4.2.3 *P. citrinum*

Após o período de incubação para cada experimento do PFF (tabela 1, página 32) realizado com *P. citrinum*, e a realização dos procedimentos de filtração e EFS,

foi possível obter as massas das frações 3 e 4 da EFS dos meios de cultura de crescimento desta linhagem. Estes resultados estão dispostos na tabela 14.

Tabela 14 – Massas (em mg) das frações 3 e 4 da EFS obtidos a partir dos experimentos de crescimento do PFF realizados para a espécie de fungo F53 (*Penicillium citrinum*).

Exp. PFF	Fração 3 da EFS	Fração 4 da EFS
1	5,0	0,5
2	5,7	2,3
3	1,5	1,4
4	0,8	0,5
5	5,8	3,6
6	6,0	0,9
7	0,6	0,5
8	1,2	1,1
9	5,8	1,6
10	5,6	1,0
11	0,8	0,4
12	1,2	0,8
13	9,7	1,6
14	9,7	5,9
15	2,4	1,8
16	1,2	0,8
17	3,2	2,1
18	5,4	1,6
19	5,6	2,2

Tal como para a linhagem *P. oxalicum*, também foram descartadas as frações 1 e 2 da EFS obtidas após experimentos de crescimento de *P. citrinum*. Observando os resultados da tabela 14, pode-se verificar que, para a fração 3, os experimentos 13 e 14 do PFF foram os que apresentaram melhores resultados para obtenção de maiores quantidades de massa. A fração 4 da EFS apresentou os experimentos 5 e 14 do PFF com melhores resultados.

Após diluir cada fração 3 e 4 da EFS dos meios de cultura de cada experimento do PFF (tabela 14) a 1 mg/mL, estas foram analisadas por CLAE-UV e monitorados em comprimento de onda de 230 nm. Para cada cromatograma foi realizado o cálculo da integral das áreas correspondentes ao intervalo de 10 a 26

minutos (conforme a figura 2, página 36). As áreas obtidas para os cromatogramas das frações de cada experimento do PFF estão dispostos na tabela 15.

Tabela 15 – Áreas dos cromatogramas obtidas por CLAE-UV para as frações 3 e 4 da EFS de cada experimento de crescimento do PFF realizado para *P. citrinum*. O comprimento de onda utilizado foi 230 nm.

Exp. PFF	Fração 3 da EFS	Fração 4 da EFS
1	1,064	1,410
2	0,946	1,728
3	1,115	1,860
4	0,880	0,195
5	0,923	2,278
6	1,518	1,690
7	1,102	0,626
8	1,193	2,634
9	1,030	1,722
10	1,399	2,071
11	0,846	0,203
12	1,218	2,546
13	1,379	1,888
14	1,158	1,960
15	1,433	2,478
16	0,907	1,559
17	0,286	1,376
18	1,180	2,472
19	0,758	0,336

Observando-se os resultados obtidos para a fração 3 da EFS de cada um dos experimentos de crescimentos de *P. citrinum* (tabela 15), pode-se verificar que os experimentos 6, 10, 12, 13 e 15 do PFF apresentam áreas um pouco superiores as dos demais experimentos. Já para a fração 4, observa-se que os experimentos 5, 8, 10, 12 e 15 do PFF, e 18 do ponto central, foram os que apresentaram melhor resultado com relação a área do cromatograma.

Os resultados obtidos para a linhagem de *P. citrinum*, após a realização dos cálculos da relação área do cromatograma/massa da fração de cada experimento de crescimento estão dispostos na tabela 16.

Tabela 16 – Relação área do cromatograma/massa obtida para as frações 3 e 4 da EFS dos experimentos de crescimento do PFF realizados para *P. citrinum*. As áreas foram medidas em comprimento de onda de 230 nm.

Exp. PFF	Fração 3 da EFS	Fração 4 da EFS
1	0,213	2,820
2	0,166	0,751
3	0,744	1,329
4	1,100	0,390
5	0,159	0,633
6	0,253	1,878
7	1,837	1,252
8	0,995	2,395
9	0,178	1,076
10	0,250	2,071
11	1,058	0,507
12	1,015	3,182
13	0,142	1,180
14	0,119	0,332
15	0,597	1,377
16	0,756	1,949
17	0,089	0,655
18	0,219	1,545
19	0,135	0,153

Observando-se os resultados apresentados na tabela 16, nota-se que para a fração 3 da EFS, o experimento 7 do PFF apresentou uma relação área/massa maior que as dos demais experimentos. Para a fração 4, observa-se que os experimentos 1, 8, 10 e 12 do PFF foram os que apresentaram uma maior relação área/massa se comparado com os demais experimentos.

Após realizar todos os cálculos de interação de 1ª e 2ª ordem das variáveis (cálculos explicados nos itens 3.5.1 e 3.5.2), para as áreas do cromatograma, os resultados obtidos estão dispostos na tabela 17.

Tabela 17 – Efeito das interações de 1ª e 2ª ordem obtidos para as áreas dos cromatogramas das frações da EFS dos experimentos de crescimento realizados para *P. citrinum*.

Interações	Fração 3 da EFS	Fração 4 da EFS
Ea	-0,041	-0,240
Eb	0,090	0,331
Ec	-0,139	-0,422
Ed	-0,079	-0,251
Ee	0,010	-0,946
Eab	-0,115	0,202
Eac	-0,056	-0,097
Ead	-0,042	0,222
Eae	-0,037	-0,107
Ebc	0,005	0,201
Ebd	-0,050	0,117
Ebe	0,316	0,788
Ecd	-0,043	-0,087
Ece	-0,040	-0,049
Ede	0,087	-0,199

Com os resultados dos cálculos de interações de 1ª e 2ª ordem obtidos (tabela 17), os gráficos de probabilidade foram construídos para as frações 3 e 4 da EFS, e os resultados estão dispostos nas figuras 15 e 16. O procedimento utilizado para a análise destes gráficos foi o mesmo que realizado para *P. oxalicum*, e está descrito no item 3.5.3.

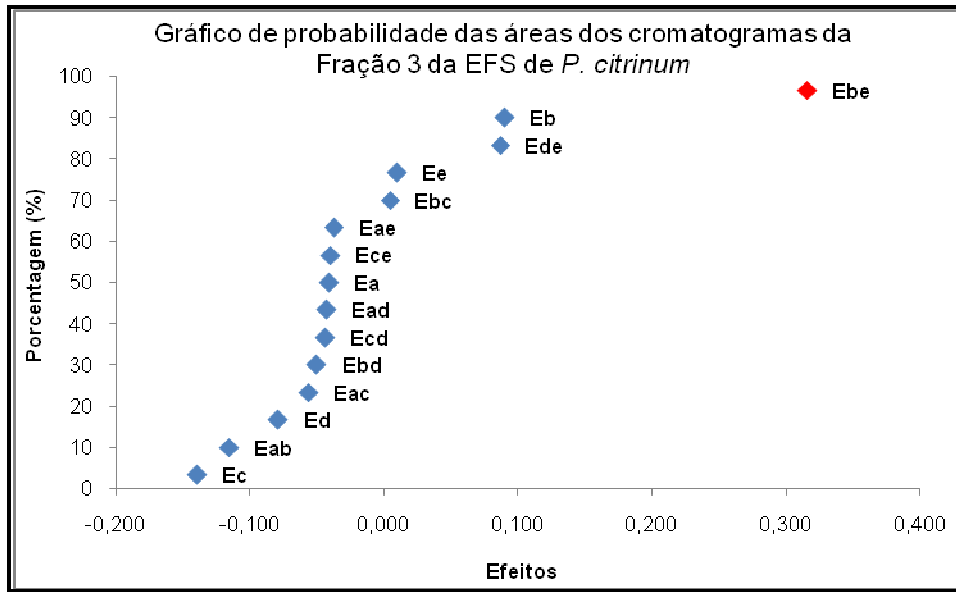


Figura 15 – Gráfico de probabilidade obtido a partir dos efeitos de 1ª e 2ª ordem dos cálculos efetuados para áreas dos cromatogramas da fração 3 da EFS dos experimentos de crescimento do PFF realizados para *P. citrinum*. Destacados em vermelho estão os efeitos significativos.

Analisando-se o gráfico de probabilidades obtido a partir das áreas dos cromatogramas da fração 3, figura 15, pode-se verificar que este apresentou apenas um efeito isolado dos demais: foi o **Ebe**, efeito da interação da [nutrientes] com a temperatura de incubação. Portanto, para a fração 3 da EFS do meio de cultura de *P. citrinum*, as variáveis [nutrientes] e temperatura de incubação foram significativas para uma maior produção de metabólitos secundários. Ainda, analisando-se o gráfico da figura 15, pode-se observar que o valor para Ebe foi positivo. Portanto, para que o sinal deste efeito seja positivo, estas variáveis devem ser utilizadas em níveis iguais, ou seja, [nutrientes] e temperatura ambos com níveis mais elevados (+): 60% da concentração total de nutrientes e temperatura 30°C, ou ambos com níveis mais baixos (-): 10% da concentração total de nutrientes e temperatura 15°C.

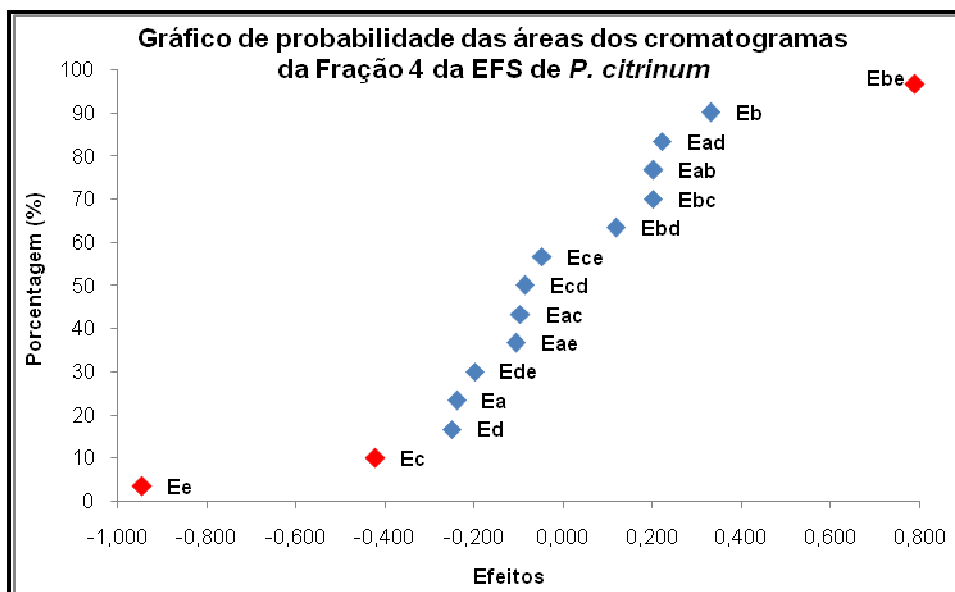


Figura 16 – Gráfico de probabilidade obtido a partir dos efeitos de 1ª e 2ª ordem dos cálculos efetuados para áreas dos cromatogramas da fração 4 da EFS dos experimentos de crescimento do PFF realizados para *P. citrinum*. Destacados em vermelho estão os efeitos significativos.

Analisando-se o gráfico de probabilidades obtido para as áreas dos cromatogramas da fração 4 da EFS obtida a partir de *P. citrinum* (figura 16), pode-se verificar que três efeitos se apresentam isolados dos demais: **Ec**, efeito do tempo de incubação; **Ee**, efeito da temperatura de incubação, e; **Ebe** efeito da interação da [nutrientes] com a temperatura de incubação. Portanto para a fração 4 da EFS de *P. citrinum* as variáveis tempo, [nutrientes] e temperatura de incubação foram significativas para uma maior produção de metabólitos secundários. Ainda analisando o gráfico da figura 16, pode-se observar que os valores para **Ec** e **Ee** foram ambos negativos. Portanto, estas duas variáveis devem ser utilizadas em seus níveis mais baixos (-), ou seja, 14 dias de incubação e temperatura de 15°C respectivamente. No entanto, a interação entre [nutrientes] com a temperatura de incubação mostra um valor positivo (+), mesmo resultado encontrado para a fração 3 (ver página anterior). Portanto, para que o sinal deste efeito seja positivo, estas variáveis devem ser utilizadas em níveis iguais, ou seja, [nutrientes] e temperatura ambos com níveis mais elevados (+) 60% da concentração total de nutrientes e

temperatura 30°C, ou ambos com níveis mais baixos (-) 10% da concentração total de nutrientes e temperatura 15°C.

Os resultados obtidos nas análises destes 2 gráficos de probabilidades (figuras 15 e 16) indicaram que as variáveis que mais influenciam a produção de metabólitos secundários por *P. citrinum* são:

- Para metabólitos presentes na **Fração 3** – duas variáveis são significativas: **[nutrientes]** (60% da concentração total de nutrientes) e **temperatura** (30°C de incubação).
- Para metabólitos presentes na **Fração 4** – três variáveis são significativas: **[nutrientes]** (60% da concentração do total de nutrientes), **tempo** (com 14 dias de incubação) e **temperatura** (com 30°C de incubação).

Portanto, de acordo com estes resultados, para que a linhagem de *P. citrinum* venha a produzir uma maior quantidade de metabólitos secundários, deve-se utilizar uma condição com a seguinte composição para o meio de cultura: 20% da concentração total de sais, 60% da concentração total de nutrientes, 14 dias de incubação, pH inicial 8 e temperatura de 30°C. Esta condição, obtida através das análises das áreas dos cromatogramas, foi nomeada de **F53OT-1**.

Após realizar todos os cálculos de interação de 1ª e 2ª ordem das variáveis (cálculos explicados nos itens 3.5.1 e 3.5.2), para a relação área/massa, os resultados são apresentados na tabela 18.

Tabela 18 – Efeito das interações de 1ª e 2ª ordem obtidos a partir da relação área/massa para as frações da EFS dos experimentos de crescimento do PFF realizados para *P. citrinum*.

Interações	Fração 3 da EFS	Fração 4 da EFS
Ea	0,034	-0,347
Eb	-0,828	-0,205
Ec	-0,017	0,141
Ed	0,169	-0,028
Ee	0,205	0,122
Eab	-0,058	0,516
Eac	-0,119	0,181
Ead	0,075	0,502
Eae	0,189	0,215
Ebc	0,050	0,533
Ebd	-0,144	0,384
Ebe	-0,146	1,168
Ecd	-0,239	-0,358
Ece	-0,075	-0,259
Ede	0,130	0,187

Com os resultados dos cálculos de interação de 1ª e 2ª ordem, foram construídos os gráficos de probabilidade para a relação área/massa de cada um dos experimentos de crescimento de *P. citrinum* para as frações 3 e 4 da EFS e os resultados são indicados nas figuras 17 e 18.

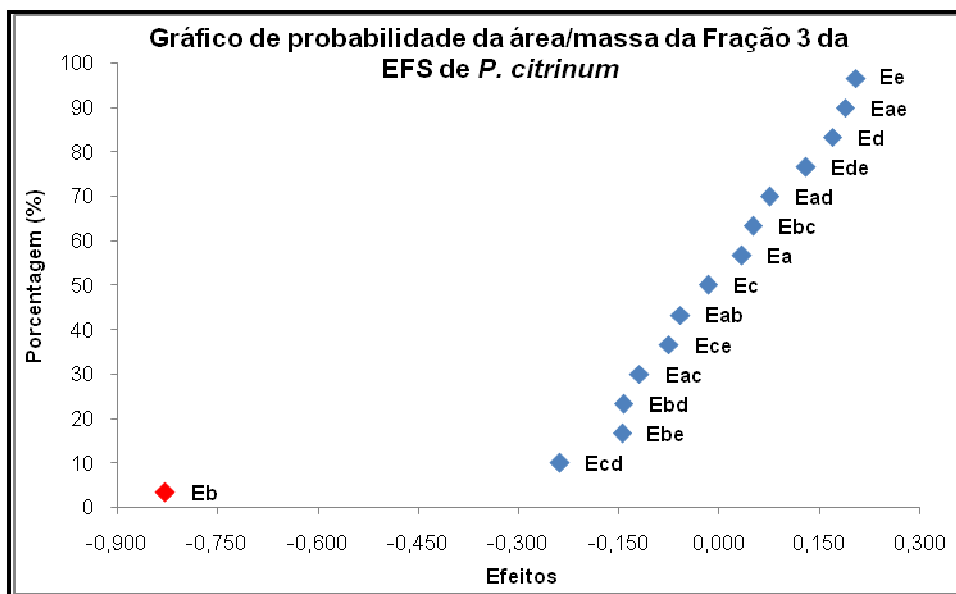


Figura 17 – Gráfico de probabilidade obtido a partir dos efeitos de 1ª e 2ª ordem dos cálculos efetuados para a relação área/massa da fração 3 da EFS dos experimentos de crescimento do PFF realizados para *P. citrinum*. Destacados em vermelho estão os efeitos significativos.

O resultado apresentado no gráfico de probabilidades obtido para a relação área/massa da fração 3 (figura 17), indica que apenas um efeito se apresentou isolado dos demais: **Eb**, efeito da [nutrientes]. Portanto para relação área/massa da fração 3 da EFS de *P. citrinum*, apenas a variável [nutrientes] foi significativa para uma maior produção de metabólitos secundários. Ainda analisando-se o gráfico da figura 17, observa-se que o valor para Eb foi negativo, portanto esta variável deve ser utilizada em seu nível mais baixo (-), ou seja, 10% da concentração total de nutrientes.

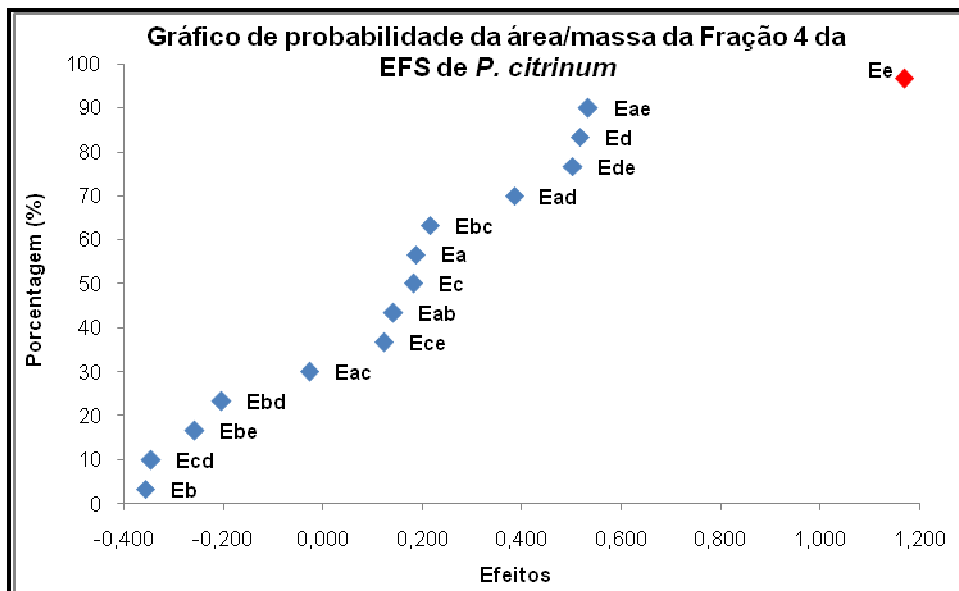


Figura 18 – Gráfico de probabilidade obtido a partir dos efeitos de 1ª e 2ª ordem dos cálculos efetuados para a relação área/massa da fração 4 da EFS dos experimentos de crescimento do PFF realizados para *P. citrinum*. Destacados em vermelho estão os efeitos significativos.

Analisando-se o gráfico de probabilidades obtido para a relação área/massa da fração 4 (figura 18), pode-se verificar que apenas um efeito se apresentou isolado dos demais: **Ee**, efeito da temperatura de incubação. Portanto para a fração 4 da EFS de *P. citrinum*, apenas a variável temperatura foi significativa para uma maior produção de metabólitos secundários. Ainda analisando-se o gráfico da figura

observa-se que o valor para Ee foi positivo. Portanto, esta variável deve ser utilizada em seu nível mais elevado (+), ou seja, 30°C de temperatura de incubação.

Os resultados obtidos das análises destes 2 gráficos de probabilidades (figuras 17 e 18), indicaram que as variáveis que influenciam a produção de metabólitos secundários por *P. citrinum* levando-se em conta a relação área/massa das frações 3 e 4 da EFS são:

- Para metabólitos presentes na **Fração 3** – apenas uma variável é significativa **[nutrientes]** (com 10% da concentração total de nutrientes).
- Para metabólitos presentes na **Fração 4** – apenas uma variável é significativa **temperatura** (com 30°C de temperatura de incubação).

De acordo com estes resultados, para que a linhagem de *P. citrinum* venha a produzir uma maior quantidade de metabólitos secundários, medida através da relação área/massa das frações 3 e 4 da EFS, deve-se utilizar a seguinte condição de crescimento: 20% da concentração de sais, 10% da concentração de nutrientes, 14 dias de incubação, pH inicial 8 e temperatura de 30°C. Esta condição, obtida através das análises das áreas dos cromatogramas, foi nomeada de **F53OT-2**.

As análises das interações de 1ª e 2ª ordem para as áreas e relação área/massa das frações 3 e 4 da EFS de *P. citrinum*, indicaram duas condições ótimas de crescimento (tabela 19).

Tabela 19 – Condições experimentais ótimas estabelecidas após análises multivariadas para uma maior produção de metabólitos secundários por *P. citrinum*.

Experimentos	Parâmetros de crescimento				
	[sais]	[nutrientes]	tempo (dias)	pH inicial	temperatura (°C)
Controle (sem alterações)	100%	100%	7	5.8	25
F53OT-1	20%	60%	14	8	30
F53OT-2	20%	10%	14	8	30

Com as duas condições ótimas encontradas para *P. citrinum*, (**F53OT-1** e **F53OT-2**), e com a finalidade de verificar qual destas condições seria melhor para a produção de maiores quantidades de metabólitos secundários, foram realizados experimentos em replicatas destas condições pré-estabelecidas. Paralelamente, foram realizados experimentos com as condições padrão de crescimento em meio de cultura MF, ou seja, 100% da concentração total de sais; 100% da concentração total de nutrientes; 14 dias de incubação; pH inicial 5,8 e temperatura ambiente. Este experimento foi nomeado de controle (**F53-C**).

Os procedimentos de contagem de esporos, quantidade de meio de cultura utilizado, preparação do inóculo, filtração, EFS e CLAE, foram os mesmos que utilizados para os experimentos do PFF, descritos no item 3.5 (Esquema 1).

Após realizar, os experimentos **F53OT-1**, **F53OT-2** e **F53-C**, em replicatas conforme as condições estabelecidas para cada um (descritas acima), cada fração foi pesada e as massas encontradas para cada experimento estão dispostas na tabela 20.

Tabela 20 – Massas (em mg) obtidas a partir dos experimentos ótimos de crescimento realizados para *P. citrinum* (F53).

Experimento	Fração 3 da EFS	Fração 4 da EFS
F53OT-1.1	5,9	0,7
F53OT-1.2	6,9	1,2
F53OT-1.3	6,7	0,9
F53OT-1.4	7,0	1,4
F53OT-1.5	7,2	1,5
F53OT-2.1	0,4	0
F53OT-2.2	0,7	0,5
F53OT-2.3	0,9	0,6
F53OT-2.4	0,7	0,4
F53OT-2.5	1,1	0,1
F53-C.1	8,0	2,4
F53-C.2	6,6	2,2
F53-C.3	7,3	2,4

Observando-se os resultados obtidos para os experimentos de crescimento em condições ótimas realizados para *P. citrinum*, verificou-se que os experimentos ótimos 1 (F53OT-1.1 a 1.5) e os experimentos realizados como controle (F53-C.1 a C.2) apresentaram resultados semelhantes para obtenção de maiores quantidades de extrato em relação a fração 3 da EFS. No entanto, para a fração 4 o experimento utilizado como controle (F53-C.1 a C.3) apresentou melhor resultado que os observados para os experimentos ótimos F53OT-1 e 2.

Cada fração de cada experimento ótimo e controle foi diluída à concentração de 1 mg/mL e analisada por CLAE. Cada cromatograma foi analisado, e suas áreas foram obtidas conforme descrito na figura 2 (página 36). Os resultados destas áreas estão na tabela 21.

Tabela 21 – Áreas dos cromatogramas obtidos a partir dos experimentos ótimos de crescimento realizados para *P. citrinum* (F53). Cromatogramas obtidos em comprimento de onda de 230 nm.

Experimento	Fração 3 da EFS	Fração 4 da EFS
F53OT-1.1	1,254	1,980
F53OT-1.2	1,103	1,573
F53OT-1.3	1,228	1,591
F53OT-1.4	1,360	1,642
F53OT-1.5	1,465	1,172
F53OT-2.1	0,179	0
F53OT-2.2	0,533	0,800
F53OT-2.3	0,543	0,770
F53OT-2.4	0,676	0,162
F53OT-2.5	0,480	0,151
F53-C.1	1,273	1,358
F53-C.2	1,209	1,758
F53-C.3	1,202	1,467

Analisando-se os resultados apresentados na tabela 21, nota-se, novamente, que para a fração 3, da EFS, os experimentos F53-C.1 a C.3 e F53OT-1.1 a 1.5 apresentaram resultados semelhantes, e ambos foram os melhores para obtenção de maiores áreas dos cromatogramas. No entanto, para a fração 4 os experimentos

ótimos 1 (F53OT-1.1 a 1.5) apresentaram áreas melhores que as observadas para os outros experimentos.

Com os resultados das massas das frações e as áreas dos cromatogramas obtidos a partir de *P. citrinum*, os cálculos para a relação área/massa também foram realizados para os experimentos ótimos e controle, e estão dispostos na tabela 22.

Tabela 22 – Relação área/massa obtida a partir dos experimentos ótimos de crescimento realizados para *P. citrinum* (F53).

Experimento	Fração 3 da EFS	Fração 4 da EFS
F53OT-1.1	0,212	2,829
F53OT-1.2	0,160	1,311
F53OT-1.3	0,183	1,767
F53OT-1.4	0,194	1,173
F53OT-1.5	0,203	0,781
F53OT-2.1	0,447	0
F53OT-2.2	0,762	1,599
F53OT-2.3	0,604	1,283
F53OT-2.4	0,965	0,404
F53OT-2.5	0,436	1,513
F53-C.1	0,159	0,566
F53-C.2	0,183	0,799
F53-C.3	0,165	0,611

Os resultados apresentados para a relação área/massa da tabela 22, indicam que para a fração 3 da EFS os experimentos ótimos 2 (F53OT-2.1 a 2.5) apresentaram melhor resultado. Para a fração 4, os dois experimentos ótimos testados mostraram resultados muito parecidos, ligeiramente melhores para o experimento ótimo 1 (F53OT-1.1 a 1.5). Ambos apresentaram melhores resultados que os encontrados para o controle (F53-C.1 a C.3).

Para melhor visualização dos resultados da otimização experimental realizada para a produção de metabólitos secundários por *P. citrinum*, a seguir (figura 19) estão representados alguns cromatogramas de experimentos do PFF, dos

experimentos ótimos (F53OT-1 e 2) e do controle (F53-C) obtidos a partir da fração 3 da EFS.

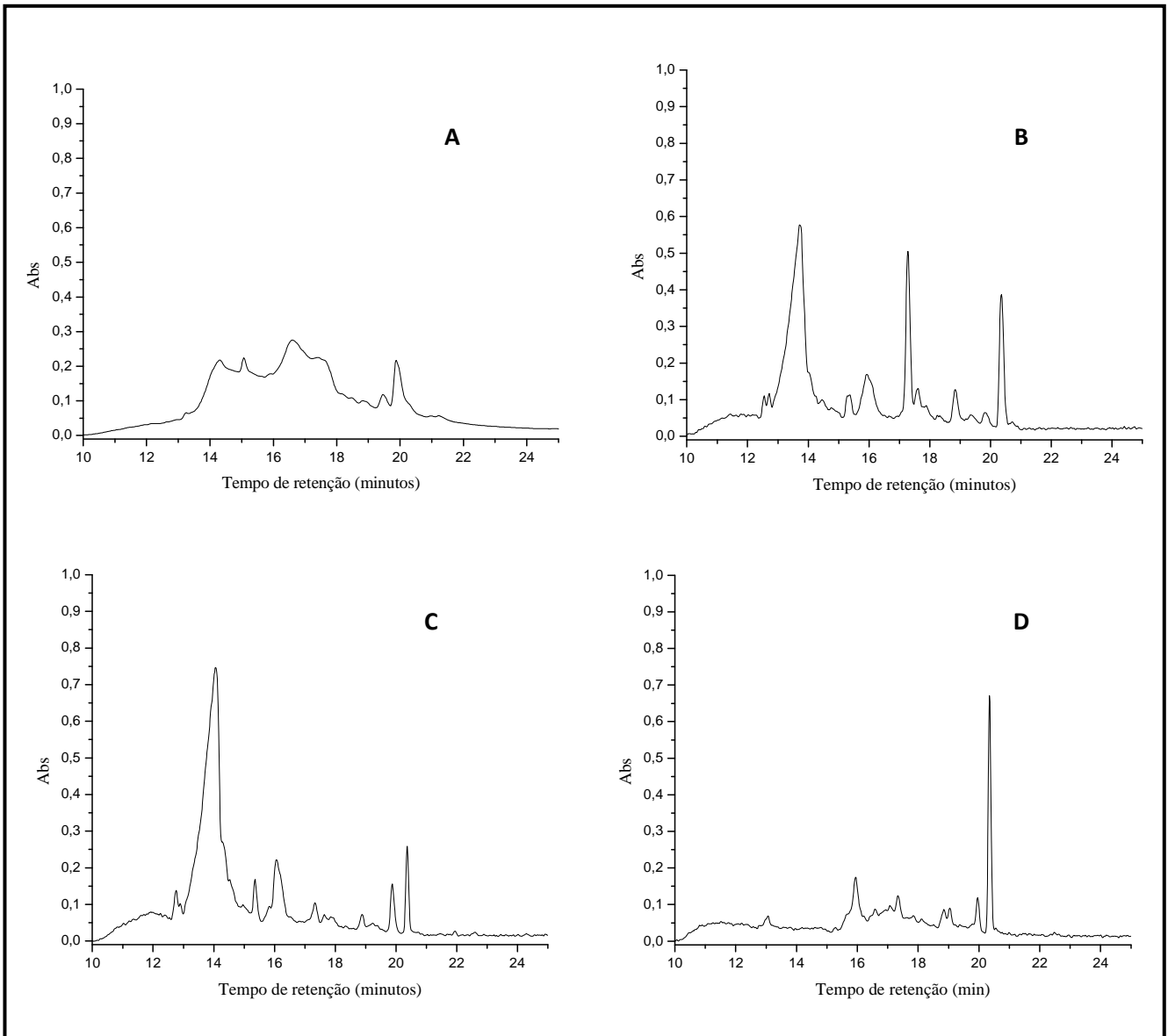


Figura 19 – Cromatogramas obtidos por CLAE-UV para as frações 3 da EFS de diferentes experimentos realizados para *P. citrinum*. Condições experimentais: coluna de fase reversa C₁₈ Synergi Fusion-RP 80 da marca Phenomenex®, de dimensões 250 x 4,6 mm com 4 µm de tamanho de partícula com um gradiente metanol-água por 40 minutos, monitorados em comprimento de onda de 230 nm. **A**) experimento 10 do PFF; **B**) experimento controle (F53-C.1 a C.3); **C**) experimento ótimo 1 (F53OT-1.1 a 1.5); **D**) experimento ótimo 2 (F53OT-2.1 a 2.5).

Os cromatogramas apresentados na figura 19 mostram que o experimento ótimo F53OT-2 (Figura 19D) nitidamente apresenta um perfil cromatográfico

diferente dos demais. Analisando-se tais cromatogramas, observa-se que a diversidade de metabólitos secundários foi bastante elevada, apresentando aproximadamente 10 compostos com diferentes tempos de retenção (t_R). Estes resultados mostram que é difícil escolher qual experimento realmente apresentou melhor resultado para uma maior produção de metabólitos secundários. O experimento ótimo F53OT-2 (figura 19D) apresentou um cromatograma mais “limpo”, ou seja, apresenta uma menor diversidade de metabólitos primários (mais polares, com menor tempo de retenção). Também verificou-se que o experimento F53OT-1 apresentou uma diversidade e quantidade de metabólitos secundários ligeiramente maior que os demais experimentos.

A seguir estão representados alguns cromatogramas de experimentos do PFF, com condições ótimas (F53OT-1 e 2) e do controle (F53-C) obtidos com a fração 4 da EFS (figura 20).

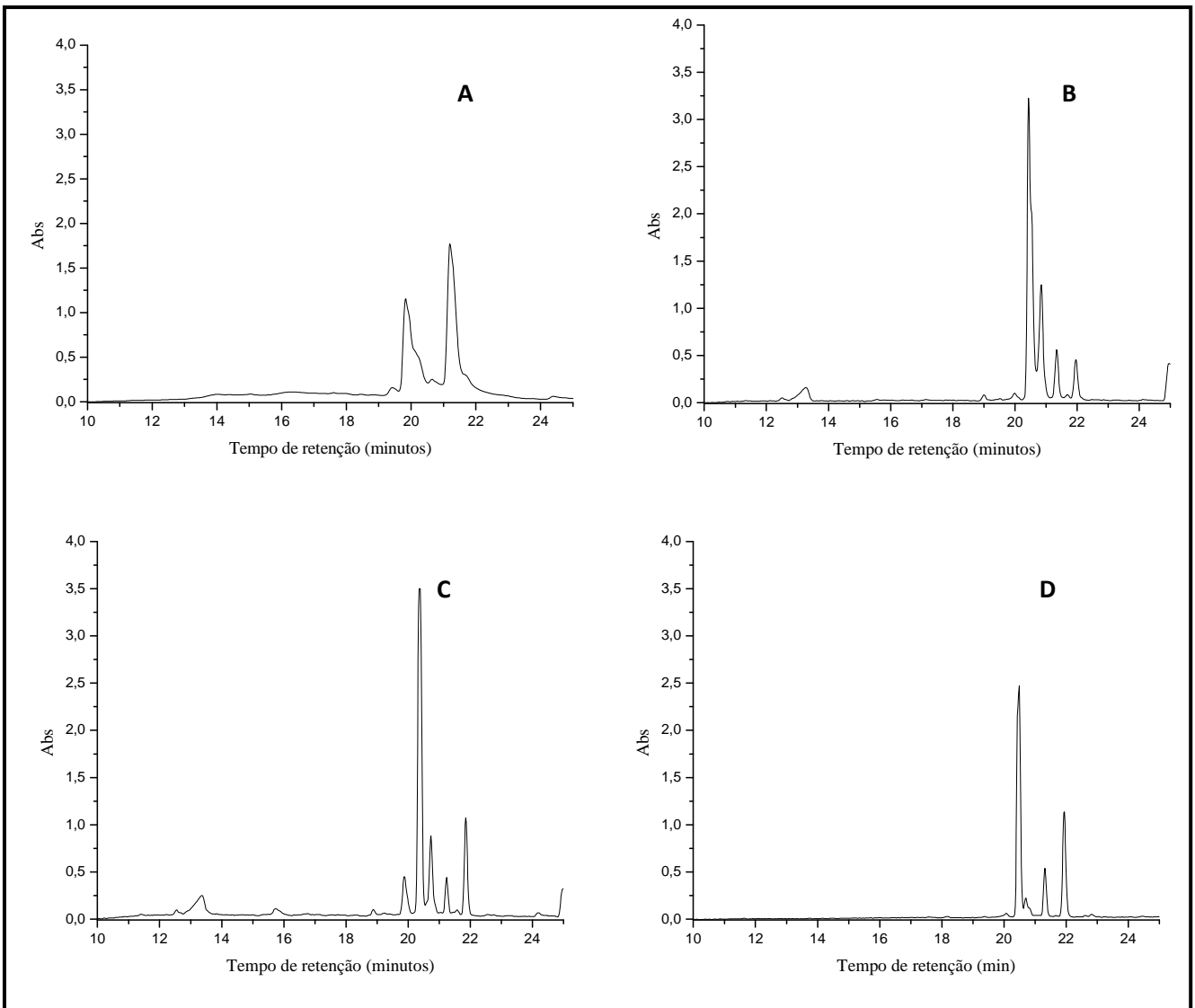


Figura 20 – Cromatogramas obtidos por CLAE-UV para as frações 4 da EFS de diferentes experimentos de crescimento realizados para *P. citrinum*. Condições experimentais: coluna de fase reversa C₁₈ Synergi Fusion-RP 80 da marca Phenomenex®, de dimensões 250 x 4,6 mm com 4 µm de tamanho de partícula com um gradiente metanol-água por 40 minutos, monitorados em comprimento de onda de 230 nm. **A)** experimento 10 do FFD; **B)** experimento controle (F53-C.1 a C.3); **C)** experimento ótimo 1 (F53OT-1.1 a 1.5); **D)** experimento ótimo 2 (F53OT-2.2 a 2.5).

Os cromatogramas apresentados na figura 20 indicam que o experimento ótimo F53OT-1 (Figura 20C), apresentou uma maior variedade de metabólitos secundários quando se compara com os demais experimentos. Pode-se observar a presença de 5 metabólitos secundários com diferentes tempos de retenção (t_R). Um primeiro com $t_R = 19,9$; um segundo com $t_R = 20,4$ (pico majoritário para os

cromatogramas das figuras 20B, 20C e 20D); um terceiro com $t_R = 20,8$; um quarto com $t_R = 21,3$ e um quinto pico com $t_R = 21,9$ minutos.

Os parâmetros experimentais utilizados para a realização do experimento F53OT-1 foram os que apresentaram melhores resultados. Portanto, estes foram escolhidos para se realizar o crescimento em maior volume, com a finalidade de obtermos material suficiente para o isolamento e identificação dos compostos produzidos pela espécie de *P. citrinum*.

4.2.4 Isolamento, purificação, caracterização e identificação dos compostos obtidos de *P. citrinum*

O procedimento de cultivo em média escala (2 L, descrito no item 3.6.2) foi realizado utilizando as seguintes condições, previamente estabelecidas após as análises multivariadas: 20% da concentração total de sais; 60% da concentração total de nutrientes; 14 dias de incubação; pH inicial 8 e temperatura de incubação de 30°C. Este foi nomeado de experimento ótimo (**F53OT**). Após o processo de filtração do meio de cultura para a separação do micélio, extração em fase sólida e evaporação do solvente realizada a partir do crescimento de 2 L de meio de cultura as massas obtidas foram:

F53OT-EFS – Fração 1 (MeOH/H₂O 25:75) – descartada.

F53OT-EFS – fração 2 (MeOH/H₂O 1:1) – descartada.

F53OT-EFS – fração 3 (MeOH/H₂O 75:25) – 159,6 mg, código F53OT-3.

F53OT-EFS – fração 4 (MeOH 100%) – 36,9 mg, código F53OT-4.

As frações 1 e 2 foram descartadas por apresentarem muitos sais e componentes do meio de cultura. As frações 3 e 4 da EFS foram submetidas a purificação por CLAE e os resultados são apresentados a seguir.

4.2.4.1 Purificação em CLAE da Fração 3 da EFS – F53OT-3

A fração 3 da EFS (massa = 159,6 mg) foi submetida à purificação por CLAE-UV. Esta apresentou o seguinte perfil cromatográfico (figura 21).

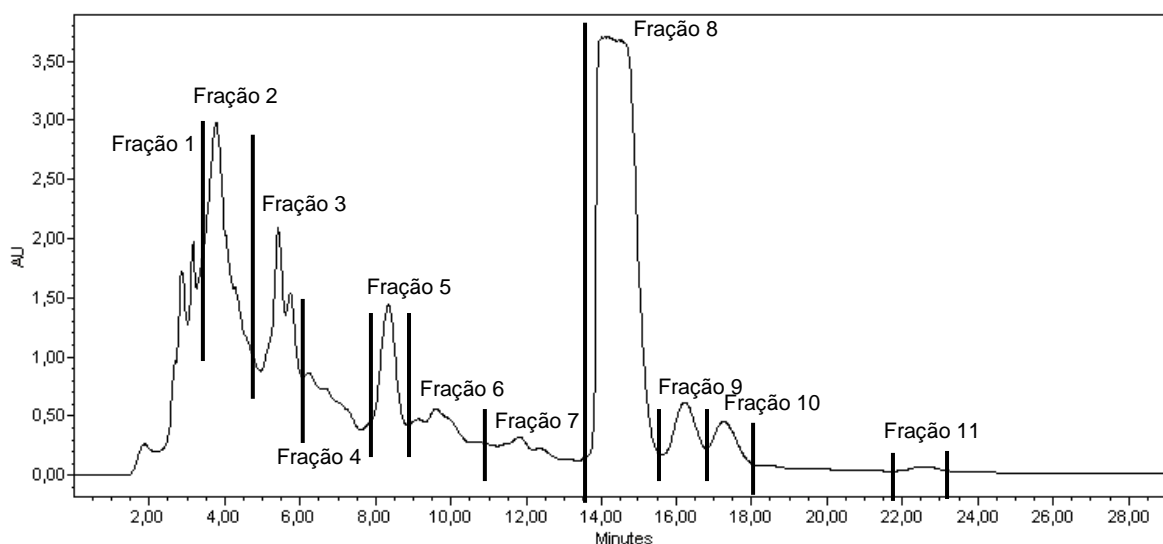


Figura 21 – Cromatograma utilizado para a purificação da fração 3 (MeOH/H₂O 75:25) obtida da EFS a partir do crescimento em 2 L de meio de cultura de *P. citrinum*. Condições de análise feita em coluna semi-preparativa C₁₈ CSC-Inertsil 150A/ODS2 (dimensões 250 x 9,4 mm; 5 µm) eluída com MeOH/H₂O 80:20 por 30 minutos com fluxo de 1 mL/min, monitorada em $\lambda = 230$ nm.

Após a separação e coleta das frações 1 a 11, observadas no cromatograma da figura 21, estas frações foram evaporadas, e, após a pesagem, suas massas foram as seguintes (tabela 23).

Tabela 23 – Frações obtidas (cromatograma da figura 21) após purificação por CLAE da fração 3 da EFS a partir do crescimento de 2 L do meio de cultura de *P. citrinum*.

Frações	Código	Massa em mg
1	F53OT-3-P1	8,3
2	F53OT-3-P2	3,9
3	F53OT-3-P3	3,6
4	F53OT-3-P4	5,9
5	F53OT-3-P5	4,7
6	F53OT-3-P6	5,8
7	F53OT-3-P7	3,5
8	F53OT-3-P8	33,8
9	F53OT-3-P9	1,4
10	F53OT-3-P10	1,7
11	F53OT-3-P11	1,0

A soma das massas destas 11 amostras totaliza 73,6 mg. Levando-se em conta que a massa da fração 3 da EFS foi 159,6 mg, obteve-se (46,1% de rendimento) desta separação cromatográfica. O motivo seria o mesmo do observado para o processo análogo realizado com F3 da EFS de *P. oxalicum*. Ou seja, a presença de componentes do meio de cultura nesta fração de EFS ou de componentes que não foram coletados por não possuírem absorção na região do UV, resultando então neste baixo rendimento cromatográfico.

Com a finalidade de verificar a pureza destas 11 frações, estas foram analisadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a um detector UV-Visível com arranjo de fotodiodos, também acoplado a um detector de espectrometria de massas (CLAE-UV-EM). As amostras que não apresentaram um grau de pureza desejável foram repurificadas. As que apresentaram um melhor grau de pureza, foram enviadas para serem analisadas por RMN-¹H.

Após realizar as análises por CLAE-UV-EM, observou-se que as frações 1, 2, 3, 4 e 6 precisaram ser repurificadas. As frações 5 e 7 apresentaram muitas impurezas relacionadas ao meio de cultura (metabólitos primários e lipídios). As frações iniciais obtidas por CLAE-UV (1 a 7) apresentam uma quantidade

considerável de nutrientes do meio de cultura durante a repurificação destas. Muitos sinais do cromatograma foram atribuídos a compostos relacionados ao meio de cultura (açúcares, aminoácidos, lipídios, nucleosídeos). Já as frações 8, 9, 10 e 11 apresentaram um maior grau de pureza.

4.2.4.2 Purificação em CLAE da Fração 4 da EFS – F53OT-4

Após a realização da filtração em celite e EFS dos 2 L de meio de cultura, obtidos do experimento de crescimento, a fração 4 da EFS (massa = 36,9 mg) foi submetida à purificação em CLAE-UV. Esta apresentou o seguinte perfil cromatográfico (figura 22).

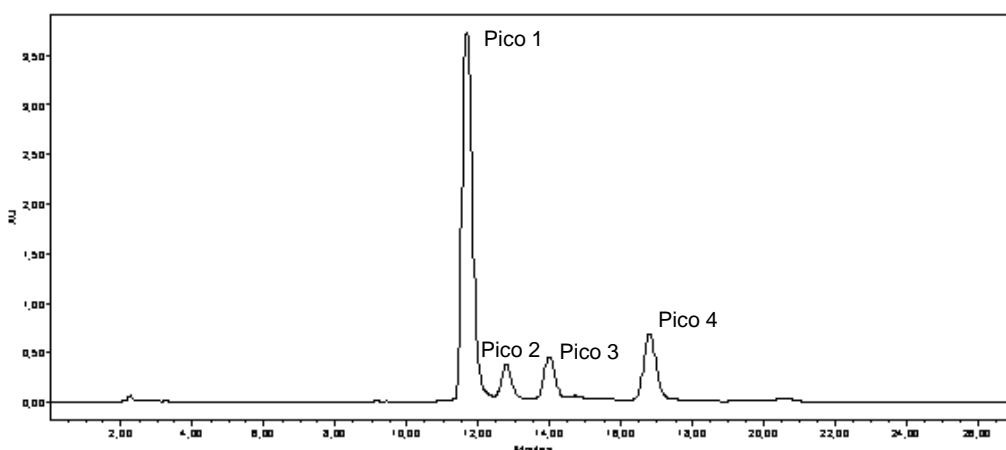


Figura 22 – Cromatograma utilizado para a purificação da fração 4 (MeOH 100%) obtida da EFS a partir do crescimento em 2 L de meio de cultura de *P. citrinum* (F53). Condições de análise: coluna analítica C₁₈ Inertsil ODS-3 (dimensões 250 x 4,6 mm; 5 µm) eluída com MeOH/H₂O 70:30 por 30 minutos com fluxo de 1 mL/minutos, monitorado em $\lambda = 230$ nm.

Após a separação e coleta dos compostos referentes aos picos 1 a 4, ilustrados no cromatograma da figura 22, estas frações foram evaporadas. As massas de cada uma das frações foram as seguintes:

Pico 1 – 11,9 mg (Amostra 12), código F53OT-4-P1

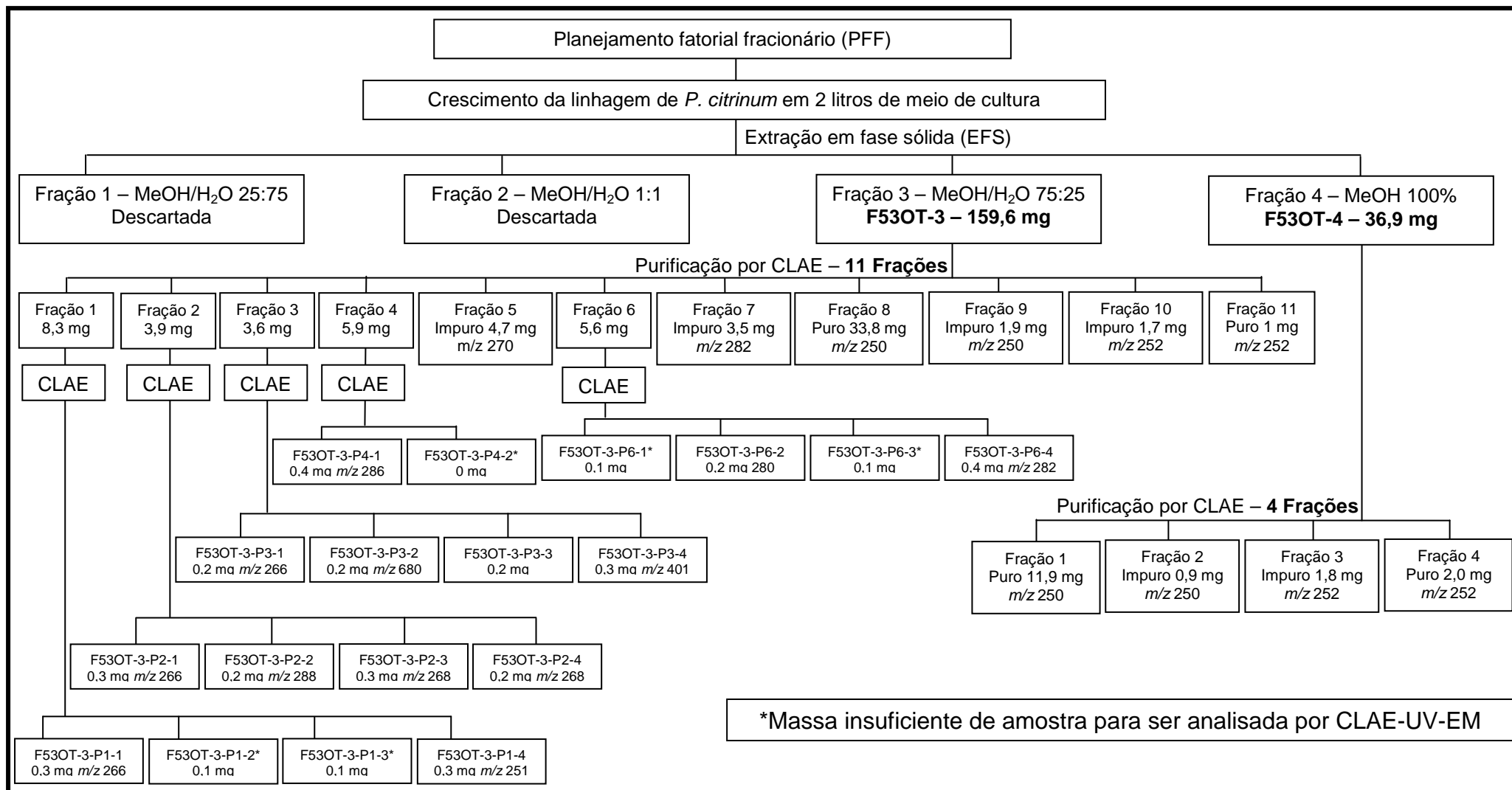
Pico 2 – 0,9 mg (Amostra 13), código F53OT-4-P2

Pico 3 – 1,8 mg (Amostra 14), código F53OT-4-P3

Pico 4 – 2,0 mg (Amostra 15), código F53OT-4-P4

Estas 4 amostras obtidas da separação da Fração 4 de EFS (F53OT-4) foram analisadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a um detector UV-Visível com arranjo de fotodiodos também acoplado a um detector de espectrometria de massas (CLAE-UV-EM).

O procedimento de separação de separação das frações 3 e 4 da EFS de 2 L de meio de cultura de *P. citrinum*, e as massas das frações obtidas, são apresentadas no esquema 2 e na tabela 24.



Esquema 2 – Fluxograma ilustrando todo o processo de purificação a partir da produção em média escala (2 L) de meio de cultura realizada para a espécie de *P. citrinum*, utilizando condições otimizadas de produção de metabólitos secundários.

Capítulo 4 – Resultados e discussão

Tabela 24 – Compostos identificados nas separações por CLAE-UV, das frações 3 e 4 da EFS, realizadas para o crescimento de 2 litros de meio de cultura otimizado para uma maior produção de metabólitos secundários por *P. citrinum*.

Código da fração	Massa da fração	Íon [M + H] ⁺	Íon [M + Na] ⁺	Fragmentos	Absorção no UV	Espectro
F53OT-3-P1-1	0,3 mg	<i>m/z</i> 266	Não observado	<i>m/z</i> em 248	243 nm	Figura 23
F53OT-3-P1-2	0,1 mg	Não analisado	Não analisado	Não analisado	Não analisado	Não analisado
F53OT-3-P1-3	0,1 mg	Não analisado	Não analisado	Não analisado	Não analisado	Não analisado
F53OT-3-P1-4	0,3 mg	<i>m/z</i> em 251	<i>m/z</i> em 273	<i>m/z</i> em 233	213; 252 e 317 nm	Figura 24
F53OT-3-P2-1	0,3 mg	<i>m/z</i> em 266	<i>m/z</i> em 288	<i>m/z</i> em 248	244 nm	Figura 23
F53OT-3-P2-2	0,2 mg	<i>m/z</i> em 288	Não observado	<i>m/z</i> em 248	244 nm	Figura 25
F53OT-3-P2-3	0,2 mg	<i>m/z</i> em 268	<i>m/z</i> em 290	<i>m/z</i> em 250	243 nm	Figura 26
F53OT-3-P2-4	0,3 mg	<i>m/z</i> em 268	<i>m/z</i> em 290	<i>m/z</i> em 250	244 nm	Figura 27
F53OT-3-P3-1	0,2 mg	<i>m/z</i> em 266	<i>m/z</i> em 288	<i>m/z</i> em 248	244 nm	Figura 23
F53OT-3-P3-2	0,2 mg	<i>m/z</i> em 268	<i>m/z</i> em 290	<i>m/z</i> em 250	244 nm	Figura 27
F53OT-3-P3-3	0,2 mg	Não analisado	Não analisado	Não analisado	Não analisado	Não analisado
F53OT-3-P3-4	0,3 mg	<i>m/z</i> em 401	Não observado	Não observado	247 e 370 nm (fracas)	Figura 28
F53OT-3-P4	0,4 mg	<i>m/z</i> em 286	<i>m/z</i> em 308	<i>m/z</i> em 268	Não observado	Figura 29
F53OT-3-P5	4,7 mg	<i>m/z</i> em 270	<i>m/z</i> em 292	<i>m/z</i> em 248 e 224	241 nm	Figura 30
F53OT-3-P6-1	0,1 mg	Não analisado	Não analisado	Não analisado	Não analisado	Não analisado
F53OT-3-P6-2	0,2 mg	<i>m/z</i> em 280	Não observado	<i>m/z</i> em 250	Não observado	Figura 31
F53OT-3-P6-3	0,1 mg	Não analisado	Não analisado	Não analisado	Não analisado	Não analisado
F53OT-3-P6-4	0,2 mg	<i>m/z</i> em 282	<i>m/z</i> em 304	<i>m/z</i> em 250	Não observado	Figura 32
F53OT-3-P7	3,5 mg	<i>m/z</i> em 282	<i>m/z</i> em 304	<i>m/z</i> em 264 e 250	Não observado	Figura 33
F53OT-3-P8	33,8 mg	<i>m/z</i> em 250	<i>m/z</i> em 272	<i>m/z</i> em 181 e 125	242 nm	Figura 34
F53OT-3-P9	1,9 mg	<i>m/z</i> em 250	<i>m/z</i> em 272	<i>m/z</i> em 181 e 125	243 nm	Figura 38
F53OT-3-P10	1,7 mg	<i>m/z</i> em 252	<i>m/z</i> em 274	<i>m/z</i> em 234; 178; 147	241 nm	Figura 39
F53OT-3-P11	1,0 mg	<i>m/z</i> em 252	<i>m/z</i> em 274	<i>m/z</i> em 183 e 127	243 nm	Figura 41
F53OT-4-P1	11,9 mg	<i>m/z</i> em 250	<i>m/z</i> em 272	<i>m/z</i> em 181 e 125	242 nm	Figura 34
F53OT-4-P2	0,9 mg	<i>m/z</i> em 250	<i>m/z</i> em 272	<i>m/z</i> em 181 e 125	243 nm	Figura 38
F53OT-4-P3	1,8 mg	<i>m/z</i> em 252	<i>m/z</i> em 274	<i>m/z</i> em 234 e 147	241 nm	Figura 39
F53OT-4-P4	2,0 mg	<i>m/z</i> em 252	<i>m/z</i> em 274	<i>m/z</i> em 183 e 127	243 nm	Figura 41

Analisando-se os resultados apresentados no esquema 2 e na tabela 24, pode-se notar compostos que possuem mesmo íon quasi-molecular $[M + H]^+$, com razão massa/carga (m/z), presentes em mais de uma fração. O pico com íon $[M + H]^+$ em m/z 266 é encontrado nas frações F53OT-3-P1-1; F53OT-3-P2-1 e F53OT-3-P3-1. O pico com íon $[M + H]^+$ em m/z 268 é identificado nas frações F53OT-3-P2-3, F53OT-3-P2-4 e F53OT-3-P3-2. As frações F53OT-3-P6-4 e F53OT-3-P7 possuem mesmo pico com íon $[M + H]^+$ em m/z 282. O pico com íon $[M + H]^+$ em m/z 250 é observado nas frações F53OT-3-P8; F53OT-3-P9; F53OT-4-P1 e F53OT-4-P2. O pico com íon $[M + H]^+$ em m/z 252 aparece nas frações F53OT-3-P10; F53OT-3-P11; F53OT-4-P3 e F53OT-4-P4. Estas amostras foram injetadas em CLAE-UV-EM e comparadas de acordo com seu tempo de retenção, para se verificar a possibilidade de serem o mesmo composto. As frações as quais verificou-se iguais íons e tempos de retenção, foram reunidas. Frações com massa superior a 1 mg foram enviadas para análises por RMN-¹H. As frações com pouca massa foram enviadas para o Canadá para análises por RMN. A tabela 25 mostra as frações que após a análise foram reunidas.

Tabela 25 – Amostras que foram reunidas por possuírem mesmo perfil químico.

Íon $[M + H]^+$ observado (m/z)	Código da Fração
266	F53OT-3-P1-1
	F53OT-3-P2-1
	F53OT-3-P3-1
268	F53OT-3-P2-3
268	F53OT-3-P2-4
	F53OT-3-P3-2
250	F53OT-3-P8
	F53OT-4-P1
250	F53OT-3-P9
	F53OT-4-P2
252	F53OT-3-P10
	F53OT-4-P3
252	F53OT-3-P11
	F53OT-4-P4

A seguir são apresentados os espectros de massas e de UV das amostras obtidas nas purificações por CLAE das frações 3 e 4 da EFS (apresentadas na tabela 24) a partir do crescimento de 2 L de meio de cultura de *P. citrnum*.

Frações – **F53OT-3-P1-1**, **F53OT-3-P2-1** e **F53OT-3-P3-1**

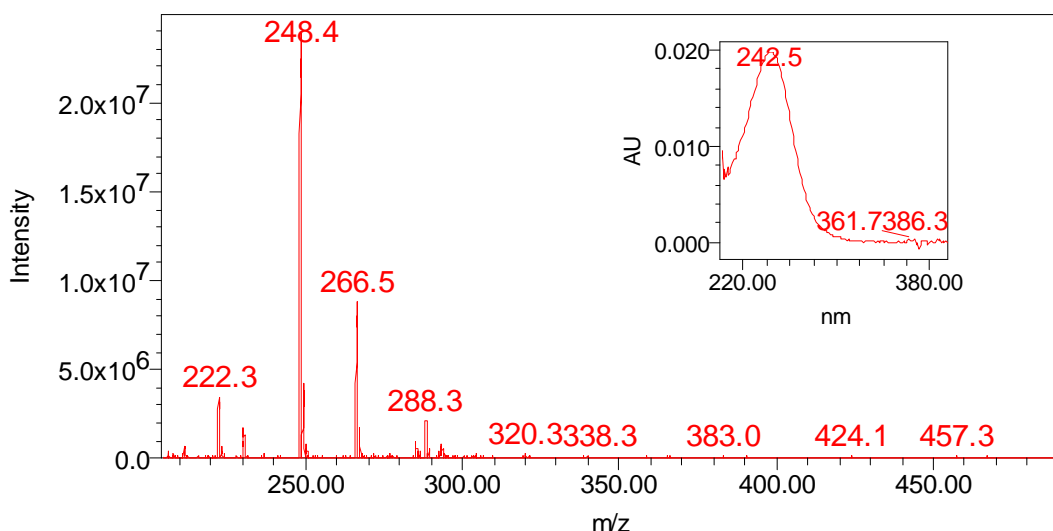
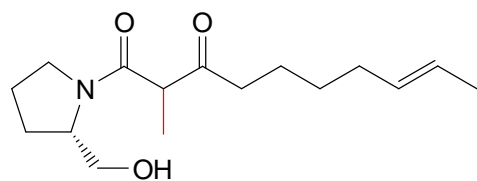
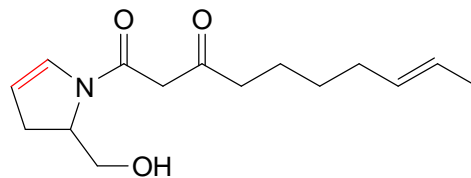


Figura 23 – Espectros de absorção na região do UV e de massas obtidos para as frações **F53OT-3-P1-1**, **F53OT-3-P2-1** e **F53OT-3-P3-1**. Condições de ionização: modo de ionização por SE⁺ e cone com voltagem de 25 V.

A análise do espectro no UV e dos fragmentos do espectro de massas obtidos para as amostras F53OT-3-P1-1, F53OT-3-P2-1 e F53OT-3-P3-1 (figura 23), indicaram pico de um íon em m/z 266 que pode corresponder ao sinal do íon quase-molecular do composto, $[M + H]^+$ e o sinal em m/z 288 poderia corresponder a molécula cationizada com átomo de sódio $[M + Na]^+$. Uma pesquisa detalhada na literatura levou-nos a verificar que a estrutura química para este composto pode ser de um análogo da scalusamida A (**46**), isolada por TSUDA e colaboradores em 2005. A diferença entre a scalusamida A e estas amostras seria do grupo metila, que se encontra entre as duas carbonilas da scalusamida A, e a presença de uma dupla ligação no anel para F53OT-3-P1-1 (**53**).



Scalusamida A
281 u.m.a.



(53) Hipótese estrutural para o composto F53OT-3-P1-1
265 u.m.a.

A quantidade de material obtido (0,3 mg) para esta amostra impossibilitou posteriores análises espectroscópicas.

Fração – F53OT-3-P1-4

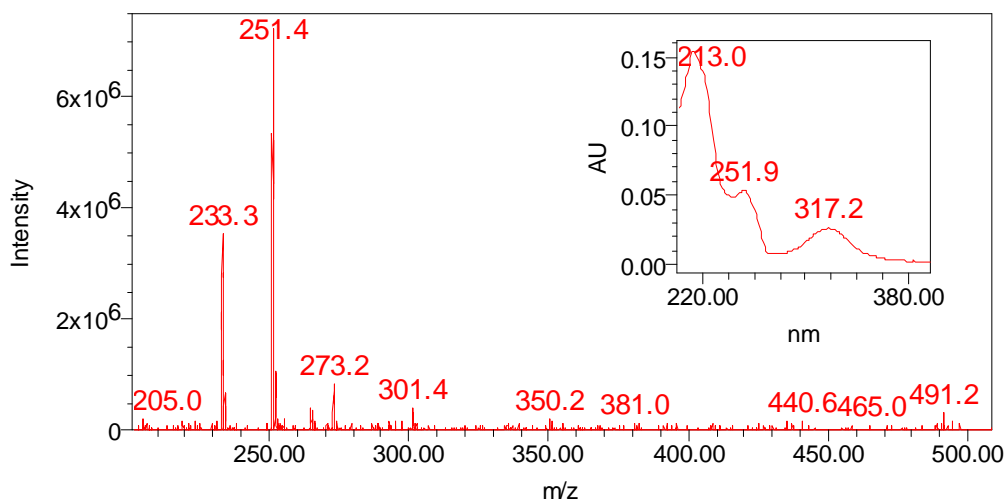
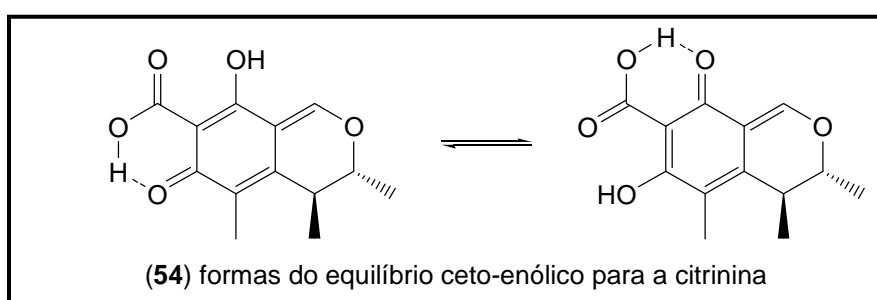


Figura 24 – Espectros de absorção na região do UV e de massas obtidos para a amostra **F53OT-3-P1-4**. Condições de ionização: modo de ionização por SE^+ e cone com voltagem de 25 V.

Também foi realizada uma análise do espectro no UV e dos fragmentos do espectro de massas obtidos para a amostra F53OT-3-P1-4 (figura 24). Observou-se que o pico do íon quasi-molecular deste composto pode ser m/z 251 que corresponde a $[M + H]^+$ e o sinal em m/z 273 pode corresponder à molécula cationizada com átomo de sódio $[M + Na]^+$. Uma pesquisa detalhada na literatura levou-nos a verificar que este composto pode ser a citrinina (31). Esta amostra foi enviada para serem realizadas análises por RMN- 1H . Após realizar a análise do espectro de RMN- 1H (figura v2-7, página 7 do volume 2), observou-se que a amostra

apresentou alguns sinais que impossibilitaram sua identificação com exatidão. Provavelmente os deslocamentos químicos observados para a amostra F53OT-3-P1-4 no seu espectro de RMN-¹H são diferentes de dados encontrados na literatura pelo fato do solvente utilizado nestas análises (DMSO-*d*₆) promover o surgimento de duas formas do equilíbrio ceto-enólico observado para a citrinina (31) (POUPKO; LUZ; DESTRO, 1997).



Fração – F53OT-3-P2-2

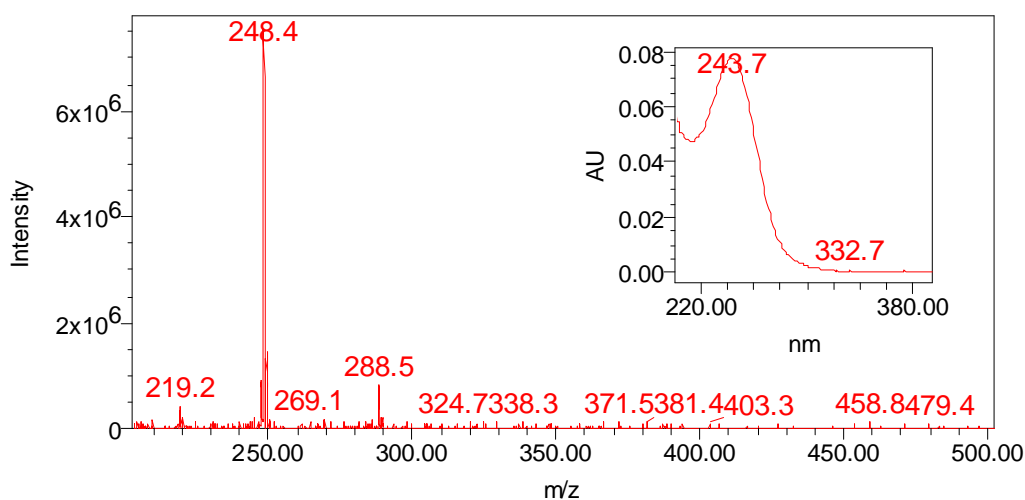


Figura 25 – Espectros de absorção na região do UV e de massas obtidos para a amostra F53OT-3-P2-2. Condições de ionização: modo de ionização por SE⁺ e cone com voltagem de 25 V.

Também foi realizada uma análise do espectro no UV e dos fragmentos do espectro de massas obtidos para a amostra F53OT-3-P2-2 (figura 25). Observou-se que o pico do íon quasi-molecular [M + H]⁺ pode ser *m/z* 288. Foi realizada uma

pesquisa detalhada na literatura e, nenhum composto com características físico-químicas semelhantes a desta amostra foi encontrado. A quantidade de material obtido (0,2 mg) não foi suficiente para realizar análises espectroscópicas.

Fração – F53OT-3-P2-3

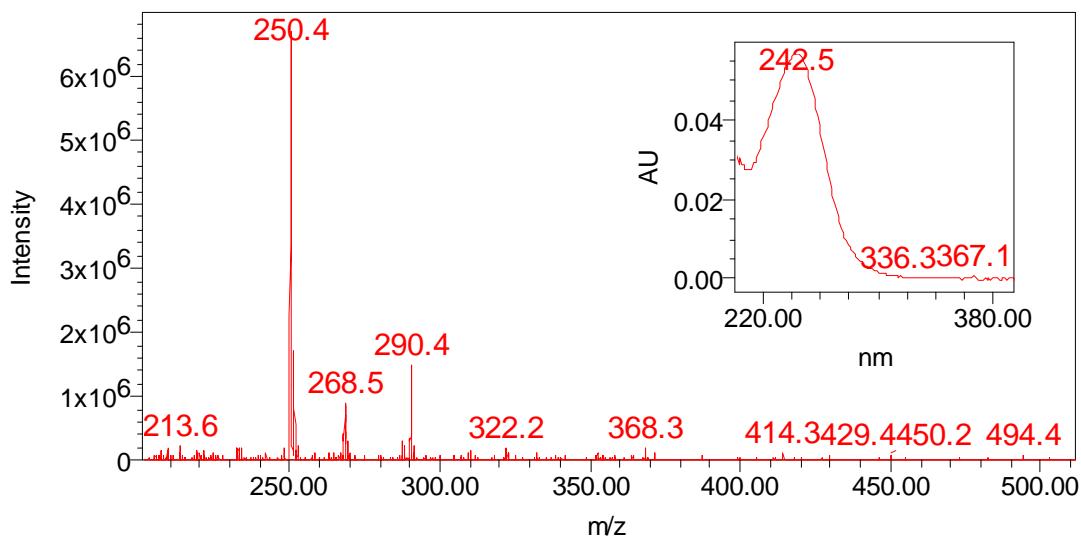
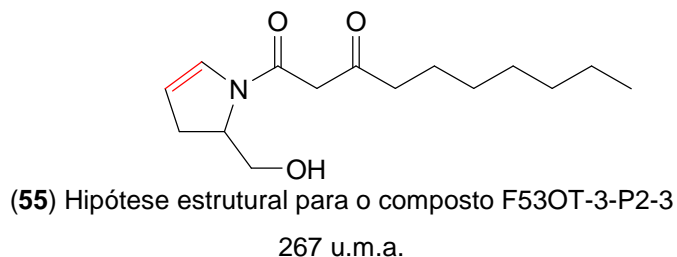
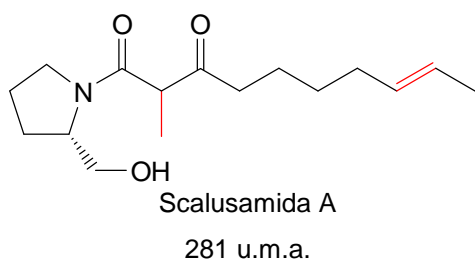


Figura 26 – Espectros de absorção na região do UV e de massas obtidos para a amostra **F53OT-3-P2-3**. Condições de ionização: modo de ionização por SE^+ e cone com voltagem de 25 V.

A análise do espectro no UV e dos fragmentos do espectro de massas obtidos para a amostra F53OT-3-P2-3 (figura 26) indicaram que o pico do íon quasi-molecular $[M + H]^+$ pode ser m/z 268, e o sinal em m/z 290 poderia corresponder a molécula cationizada com átomo de sódio $[M + Na]^+$. Uma pesquisa detalhada na literatura mostrou que este composto também pode ser um análogo das scalusamidas, semelhante a estrutura proposta para F53OT-3-P1-1 (**53**) sem a dupla na cadeia lateral (**55**). Esta estrutura foi proposta pelo fato de que as scalusamidas não possuem grupo cromóforo. No entanto, se uma dupla ligação for inserida no anel da scalusamida, esta terá uma absorção no UV próxima de 240 nm. Essa dedução foi realizada com base nos espectros de UV observados em outros compostos que foram posteriormente isolados (por exemplo o espectro de UV da

amostra F53OT-3-P8 **56**, citado logo abaixo página 113) e possuem a estrutura do anel idêntico a do proposto para **55**.



Também não foi possível realizar análises por RMN para confirmar a estrutura química desta amostra, pelo fato de pouca quantidade de material ter sido obtida (0,3 mg).

Frações – F53OT-3-P2-4 e F53OT-3-P3-2

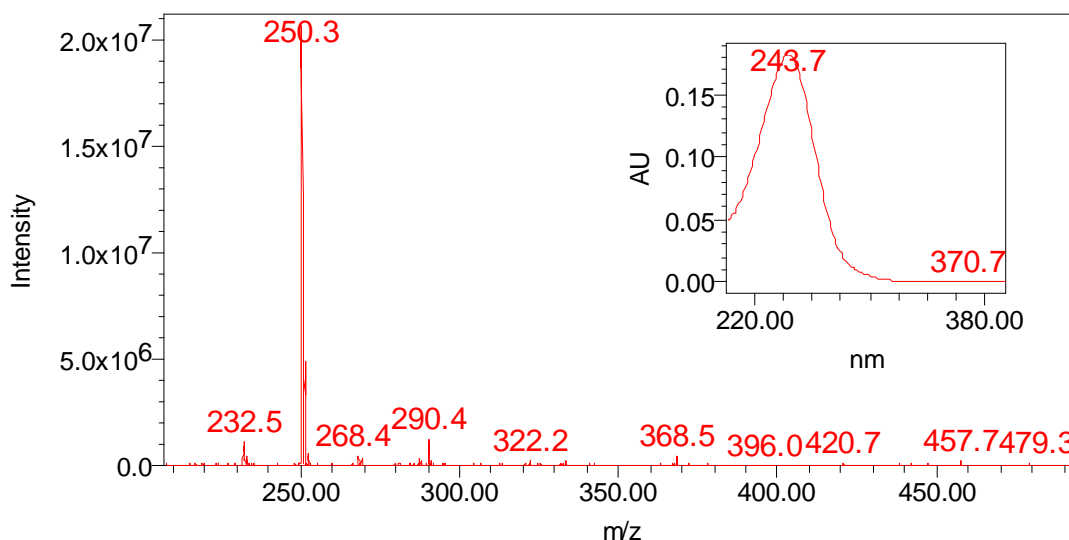


Figura 27 – Espectros de absorção na região do UV e de massas obtidos para as frações **F53OT-3-P2-4** e **F53OT-3-P3-2**. Condições de ionização: ionização por SE⁺ e cone com voltagem de 25 V.

Análises dos espectros no UV e dos fragmentos do espectro de massas das amostras F53OT-3-P2-4 e F53OT-3-P3-2 (figura 27), indicaram que estas podem ser um isômero da amostra F53OT-3-P2-3 (figura 26), pois possuem espectros de UV e massas semelhantes mas, diferentes tempos de retenção. A quantidade de material obtida (0,4 mg) também foi insuficiente para realizar análises por RMN.

Fração – F53OT-3-P3-4

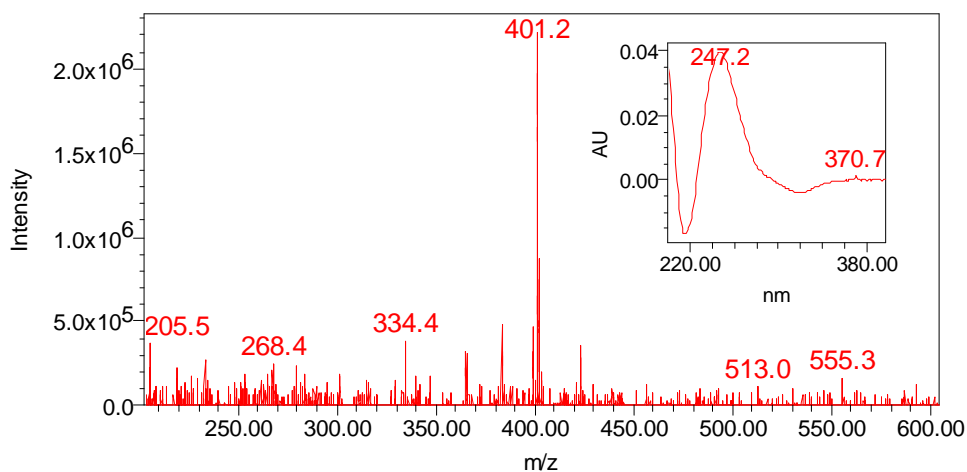


Figura 28 – Espectros de absorção na região do UV e de massas obtidos para a amostra **F53OT-3-P3-4**. Condições de ionização: modo de ionização por SE^+ e cone com voltagem de 25 V.

A análise do espectro no UV indica que esta amostra absorve pouco. Para o espectro de massas observa-se que o íon quasi-molecular $[M + H]^+$ pode ser m/z 401. Uma pesquisa detalhada na literatura não indicou nenhum composto com um perfil físico-químico semelhante ao observado para esta amostra. A quantidade de massa obtida para esta amostra foi insuficiente para serem realizadas posteriores análises espectroscópicas.

Fração – F53OT-3-P4-1

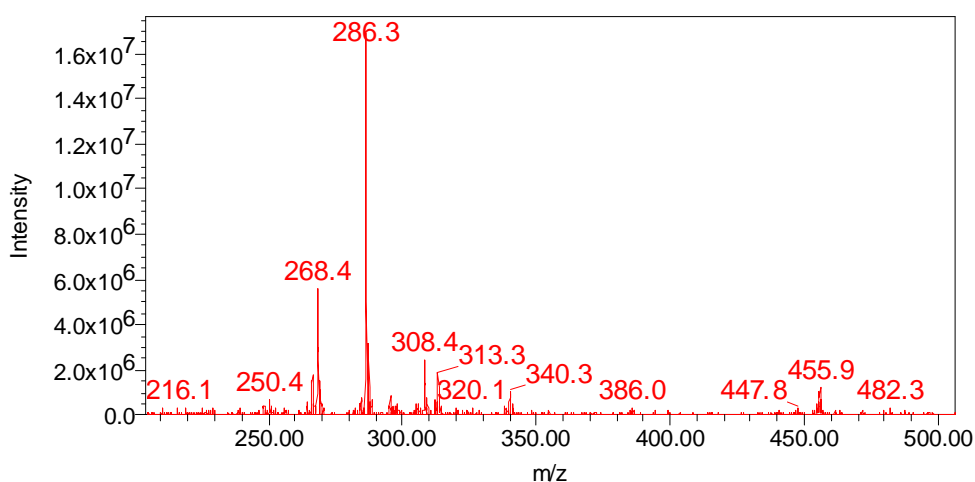


Figura 29 – Espectro de massas referente a amostra **F53OT-3-P4-1** obtida a partir da purificação da fração F53OT-3-P4. Condições de ionização: ionização por SE^+ e cone com voltagem de 25 V.

A análise dos fragmentos do espectro de massas do composto F53OT-3-P4-1 (figura 29) indicou que o pico do íon quasi-molecular $[M + H]^+$ pode ser m/z 286. O íon em m/z 308 seria a molécula cationizada com átomo de sódio, $[M + Na]^+$. A não-absorção na região do UV indica que o composto isolado desta fração pode ser um análogo de alguma das scalusamida (46, 47, e 48).

A quantidade de material obtida para esta amostra não foi suficiente para elucidar sua estrutura química.

Fração – F53OT-3-P5

Ao ser analisada por CLAE-UV-EM, esta amostra indicou apresentar uma quantidade muito grande de componentes do meio de cultura. Foi possível identificar a presença de um metabólito secundário com o seguinte espectro de massas:

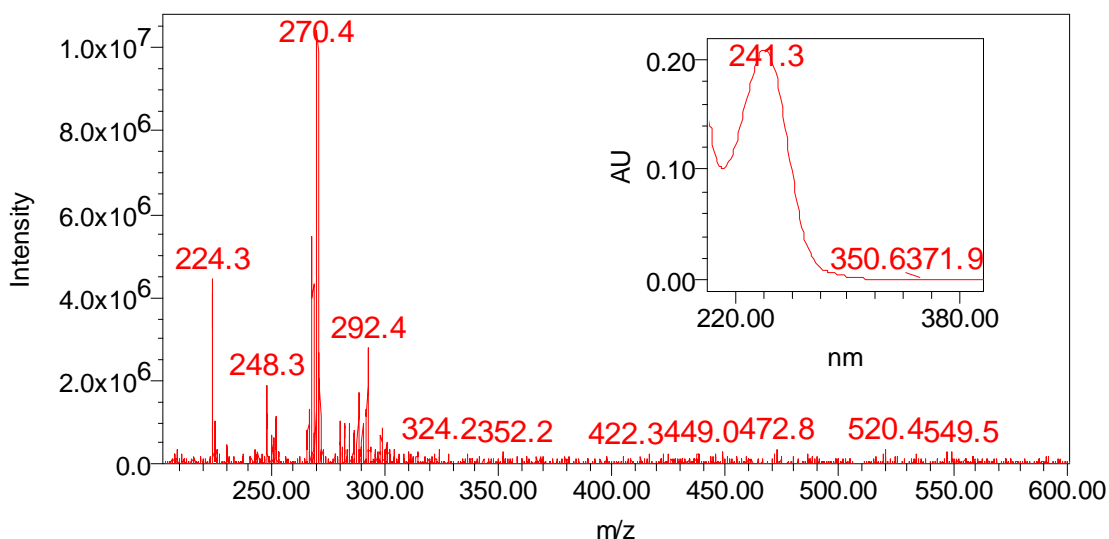


Figura 30 – Espectros de absorção na região do UV e de massas obtidos para a fração F53OT-3-P5. Condições de ionização: modo de ionização por SE⁺ e cone com voltagem de 25 V.

A análise do espectro no UV e dos fragmentos do espectro de massas do composto F53OT-3-P5 (figura 30) indicou que o pico do íon quasi-molecular $[M + H]^+$ pode ser m/z 270. O íon em m/z 292 seria a molécula cationizada com átomo de

sódio, $[M + Na]^+$. O composto presente nesta fração pode ser um análogo de F53OT-3-P2-3 (**54**) (figura 26). A quantidade de material obtida para esta fração torna inviável a repurificação para elucidar sua estrutura química.

Fração – **F53OT-3-P6-2**

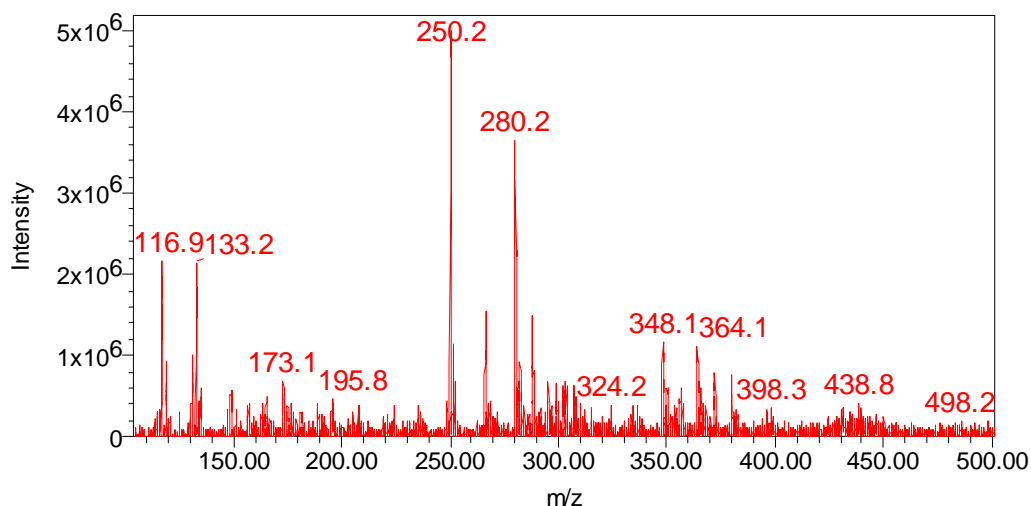


Figura 31 – Espectro de massas referente a amostra **F53OT-3-P6-2** obtida a partir da purificação da fração F53OT-3-P6. Condições de ionização: ionização por SE⁺ e cone com voltagem de 25 V.

A análise dos espectros de massas obtidos para a amostra F53OT-3-P6-2 (figura 31) indicou que o pico do íon quasi-molecular $[M + H]^+$ pode ser m/z 280. Esta substância não possui absorção na região do UV.

Fração – F53OT-3-P6-4

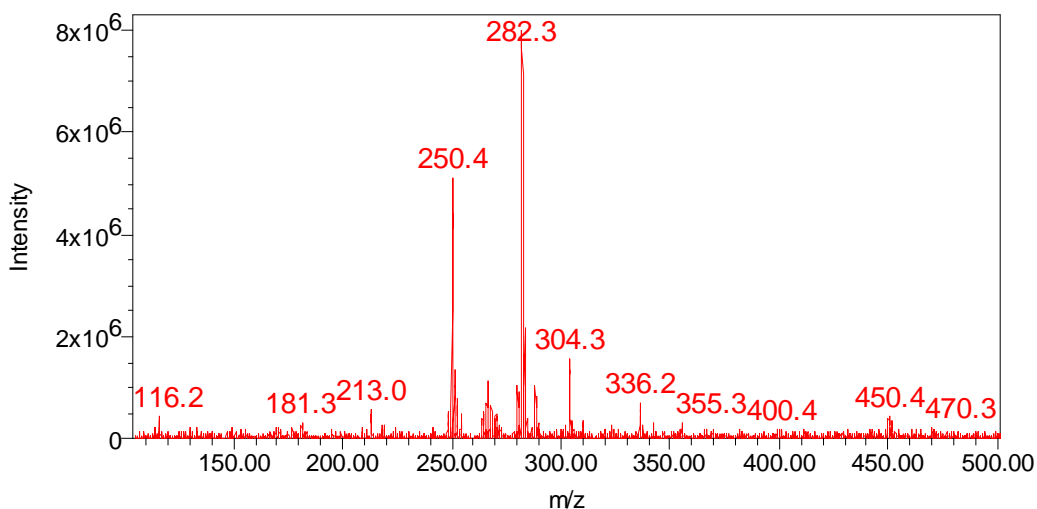
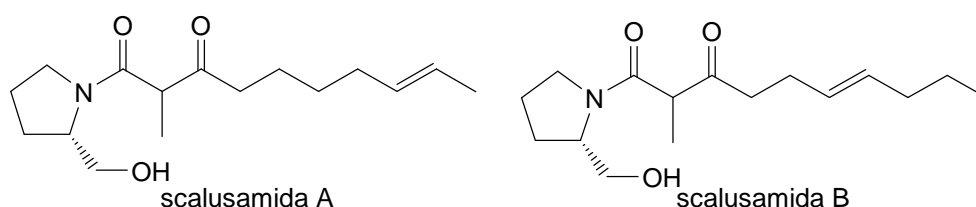


Figura 32 – Espectro de massas referente a amostra **F53OT-3-P6-4** obtida a partir da purificação da fração F53OT-3-P6. Condições de ionização: ionização por SE^+ e cone com voltagem de 25 V.

A análise dos espectros de massas obtidos para a amostra F53OT-3-P6-4 (figura 32) indicou que o pico do íon quasi-molecular $[M + H]^+$ pode ser m/z 282. O íon em m/z 304 seria a molécula cationizada com átomo de sódio, $[M + Na]^+$. Esta substância, também não possui absorção na região do UV. Uma vasta busca na literatura indicou compostos que possuem as características semelhantes das observadas para esta amostra: as scalusamidas A (46) e B (47). A quantidade de material obtida para esta amostra também foi insuficiente para serem realizadas análises espectroscópicas.



As scalusamidas A e B possuem 281 u.m.a.. Portanto, estas substâncias vão apresentar o pico do íon quasi-molecular m/z 282, e estas não possuem cromóforo. Logo, não será observada absorção na região do UV para estas moléculas. Devido a

pouca quantidade de material obtida para estas amostras, não foi possível elucidar as estruturas químicas para estes compostos.

Fração – F53OT-3-P7

Esta amostra apresentou uma quantidade muito grande quantidade de componentes do meio de cultura. A análise por CLAE-UV-EM indicou, dentre os muitos interferentes, a presença de um metabólito secundário com o seguinte espectro de massas:

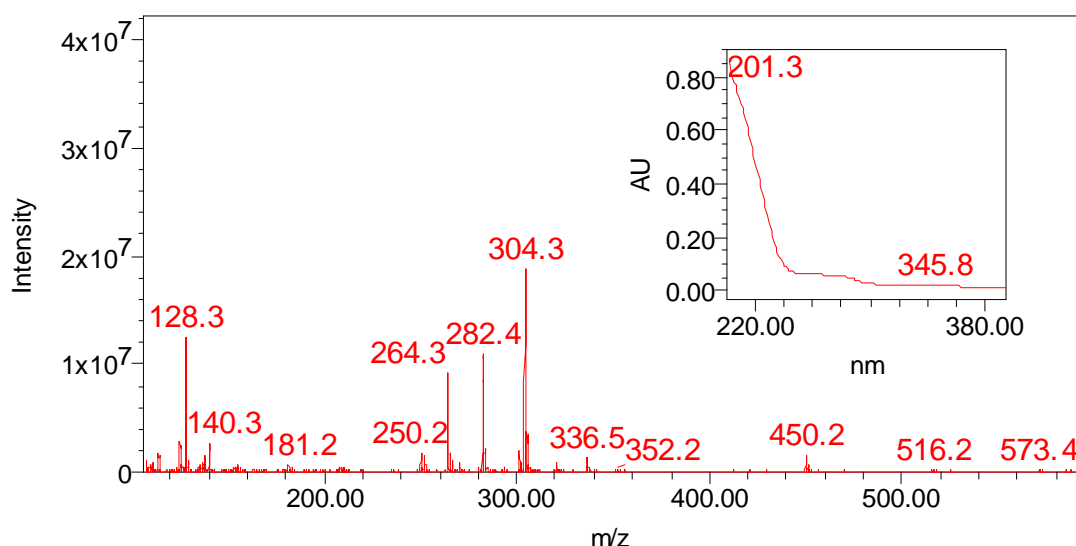


Figura 33 – Espectros de absorção na região do UV e de massas obtidos para a fração F53OT-3-P7. Condições de ionização: modo de ionização por SE⁺ e cone com voltagem de 25 V.

O íon em m/z 282 pode ser correspondente ao íon quasi-molecular $[M + H]^+$, e o íon em m/z 304 seria a molécula cationizada com átomo de sódio, $[M + Na]^+$. O espectro de massas apresentado na figura 33 é semelhante ao observado para a amostra F53OT-3-P6-4 (figura 32). Este composto pode ser uma das scalusamidas A ou B. Pelo fato desta amostra apresentar muitas impurezas não foi possível repurificá-la.

As amostras 8, 9, 10 e 11 apresentaram um perfil cromatográfico com um grau de pureza melhor que as frações anteriores, e os resultados estão destacados a seguir.

Frações – F53OT-3-P8 e F53OT-4-P1

Estas amostras foram analisadas por CLAE-UV-EM, e apresentam um bom grau de pureza. Os espectros de absorção na região do UV e de massas foram os seguintes:

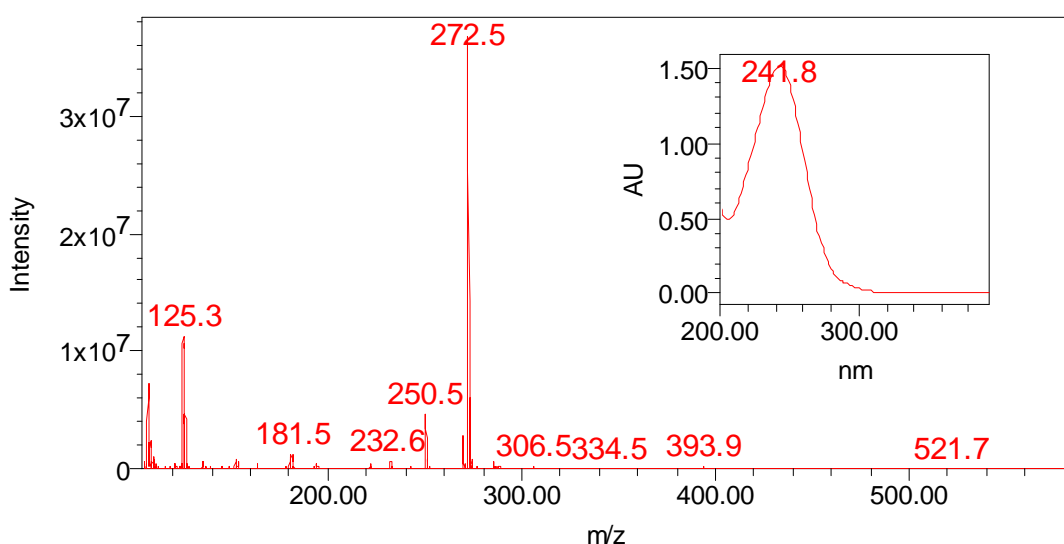
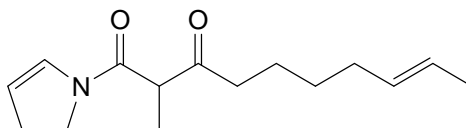


Figura 34 – Espectros de absorção na região do UV e de massas obtidos para as amostras **F53OT-3-P8** e **F53OT-4-P1**. Condições de ionização: ionização por SE⁺ e cone com voltagem de 25 V.

As amostras F53OT-3-P8 e F53OT-4-P1 (figura 34), apresentaram apenas uma banda de absorção no UV em 242 nm. A análise dos fragmentos do espectro de massas apresentou o íon [M + H]⁺ em *m/z* 250, e um outro íon em *m/z* 272, que pode ser considerado como a molécula cationizada com átomo de sódio, [M + Na]⁺. Uma vasta busca na literatura indicou um composto isolado em 1999 por CANTIN e colaboradores, que possui características químicas semelhantes das obtidas para a amostra F53OT-3-P8.



(56) (8E)-1-(2,3-diidropirrol-1-il)-2-metildec-8-eno-1,3-diona

Esta substância (**56**) possui 249 u.m.a. e apenas uma banda de absorção na região do UV em 243 nm. Para confirmar a estrutura da amostra F53OT-3-P8, esta foi enviada para serem realizadas análises de RMN de ^1H e ^{13}C . Após realizar as análises dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C obtidos (respectivamente, figuras v2-8 e v2-9, volume 2), observou-se que estes apresentaram sinais que indicaram a presença de um composto majoritário e um composto minoritário. Sucessivas tentativas de separar esta possível mistura de dois compostos se mostraram totalmente infrutíferas. Assim, consideramos ter isolado duas formas interconvertíveis do mesmo composto. Decidiu-se, então, realizar análises de RMN- ^1H da amostra F53OT-3-P8 em diferentes solventes deuterados: $\text{DMSO}-d_6$ (figura v2-8, volume 2), CDCl_3 (figura v2-10, volume 2), $\text{MeCN}-d_3$ (figura v2-11, volume 2) e $\text{MeOH}-d_4$ (figura v2-12, volume 2). Verificou-se que os dois conjuntos de sinais são visíveis em qualquer destes solventes, não havendo favorecimento de uma forma sobre outra. Sendo assim, foi decidido identificar tais substâncias na forma de “mistura”. A análise dos espectros de RMN- ^1H e ^{13}C (respectivamente, figuras v2-8 e v2-9) da amostra F53OT-3-P8 permitiu-nos construir a Tabela 26, e comparar os nossos dados obtidos com os da literatura.

Tabela 26 – Dados dos deslocamentos químicos de RMN-¹H (400 MHz) e RMN-¹³C (100 MHz) obtidos em DMSO-*d*₆ para a amostra F53OT-3-P8 comparados com dados da literatura (CANTIN et al., 1999) obtidos em solvente CDCl₃ para o composto **56**.

Posição	F53OT-3-P8	CANTIN et al., 1999	F53OT-3-P8	CANTIN et al., 1999
	δ (ppm) ¹³ C	δ (ppm) ¹³ C	δ (ppm) ¹ H (mult, integral)	δ (ppm) ¹ H (mult, integral)
2	129,3 e 128,6*	129,5 e 128,5	6,91 e 6,81* (m, 1H)	6,5 e 6,9 (m+m, 1H)
3	111,9 e 111,7*	113,1 e 111,6	5,30 e 5,32* (m, 1H)	5,3 (m, 1H)
4	27,6 e 29,6*	28,2	2,57 e 2,71* (m, 2H)	2,3 e 2,8 (m+m, 2H)
5	44,9 e 45,3*	45,5	3,70 e 3,70* (m, 2H)	3,9 (m, 2H)
6	166,1	165,9		
7	50,5 e 51,1*	53,4	3,96 e 3,87* (q, 1H)	3,5 e 3,6 (q+q, 1H)
8	206,2 e 206,5*	207,2		
9	39,8	39,2	2,42 (t, 2H)	2,5 (m, 2H)
10	22,4	23,1	1,43 (m, 2H)	1,5 (m, 2H)
11	28,2	29,0	1,23 (m, 2H)	1,3 (m, 2H)
12	31,6	32,3	1,91 (m, 2H)	2,0 (m, 2H)
13	130,9	131,0	5,37 (m, 1H)	5,4 (m, 1H)
14	124,5	125,2	5,35 (m, 1H)	5,4 (m, 1H)
15	17,6	17,9	1,60 (t, 3H)	1,4 (d+d, 3H)
16	12,6 e 12,5*	13,2	1,14 e 1,17* (d, 3H)	1,6 e 1,7 (m+m, 3H)

*deslocamentos químicos do rotâmero minoritário

Com estes resultados foi confirmada que a estrutura química da amostra F53OT-3-P8 se trata, realmente, a do composto **56**. Após realizar a determinação estrutural, observou-se a possibilidade de as duas formas interconvertíveis serem isômeros rotacionais. Isso ocorre porque estes compostos apresentam grupos amida N¹-C⁶, a qual apresenta dois rotâmeros de rotação restrita em solução, como ilustrado na figura 35.

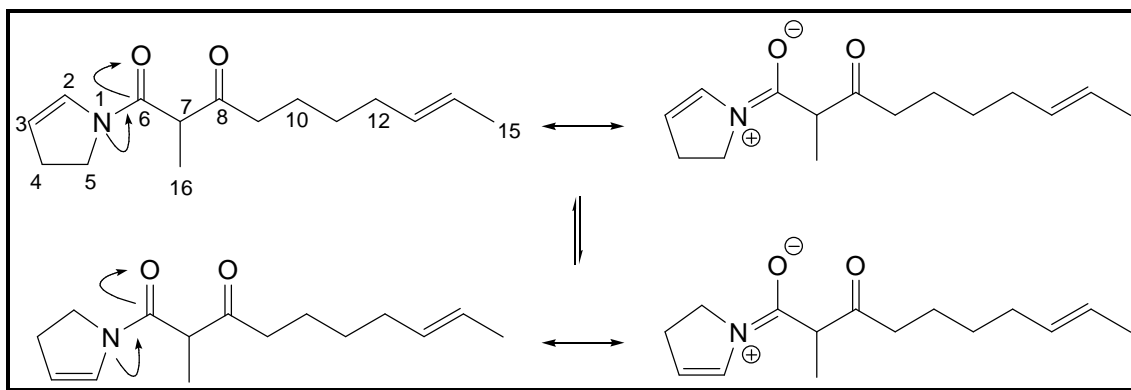


Figura 35 – Interconversão dos isômeros rotacionais para **56**.

Para confirmar a existência destes rotâmeros foram realizados experimentos de RMN-¹H (figuras v2-13 a v2-18, volume 2) em diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60, 70 e 80°C). A elevação da temperatura propicia o deslocamento dos pares de elétrons mais rapidamente e, portanto, devem ser observados os deslocamentos químicos de apenas um destes rotâmeros. A figura 36 apresenta os espectros de RMN-¹H obtidos para a amostra F53OT-3-P8 realizados a diferentes temperaturas.

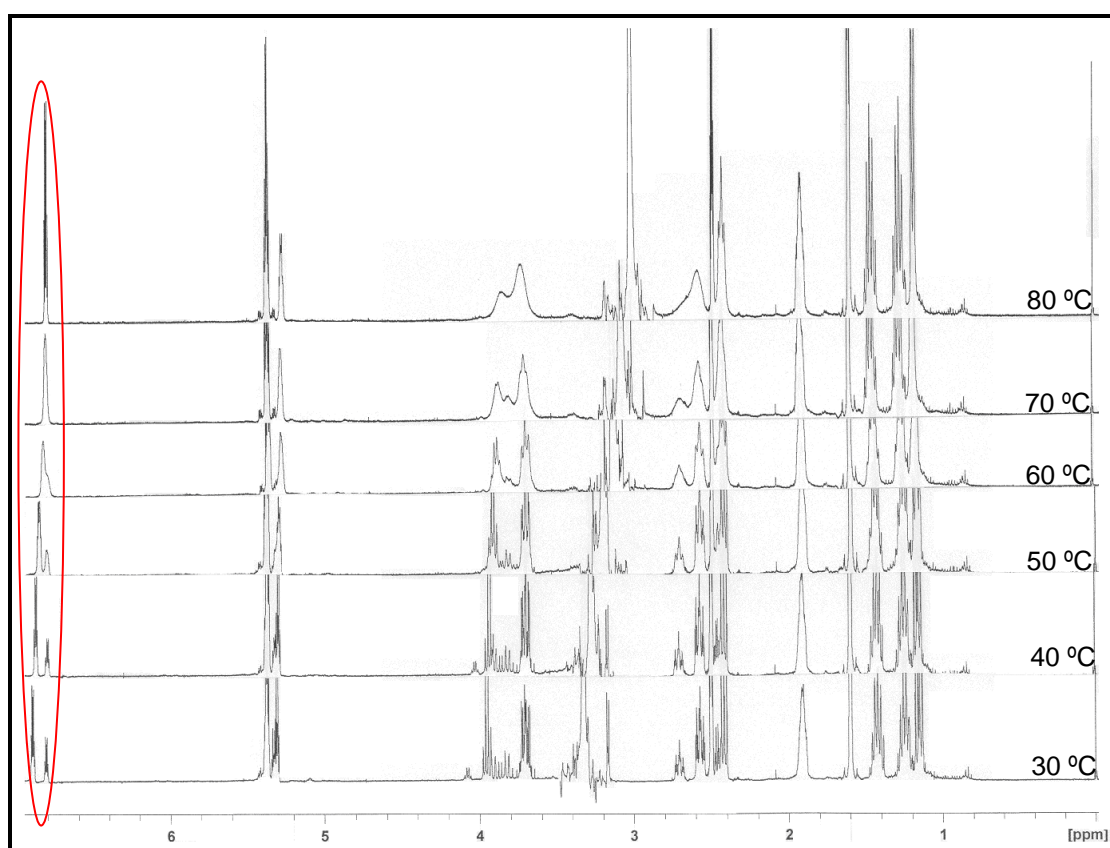


Figura 36 – Espectros de RMN-¹H obtidos para a amostra F53OT-3-P8. Análises realizadas a diferentes temperaturas em equipamento de 400 MHz.

A região destacada em vermelho na figura 36 é típica de hidrogênios de dupla ligação. Nota-se que, à temperatura de 80 °C há apenas um sinal de deslocamento químico, indicando que a barreira energética (ΔDE) de rotação restrita foi ultrapassada e a ligação N¹-C⁶ apresenta rotação livre.

Os autores que relataram o isolamento de **56** não discutem a presença de dois rotâmeros para este composto.

Definida a estrutura química para a amostra F53OT-3-P8, e com base nos fragmentos do espectro de massas, pôde-se propor a seguinte fragmentação para este composto (figura 37).

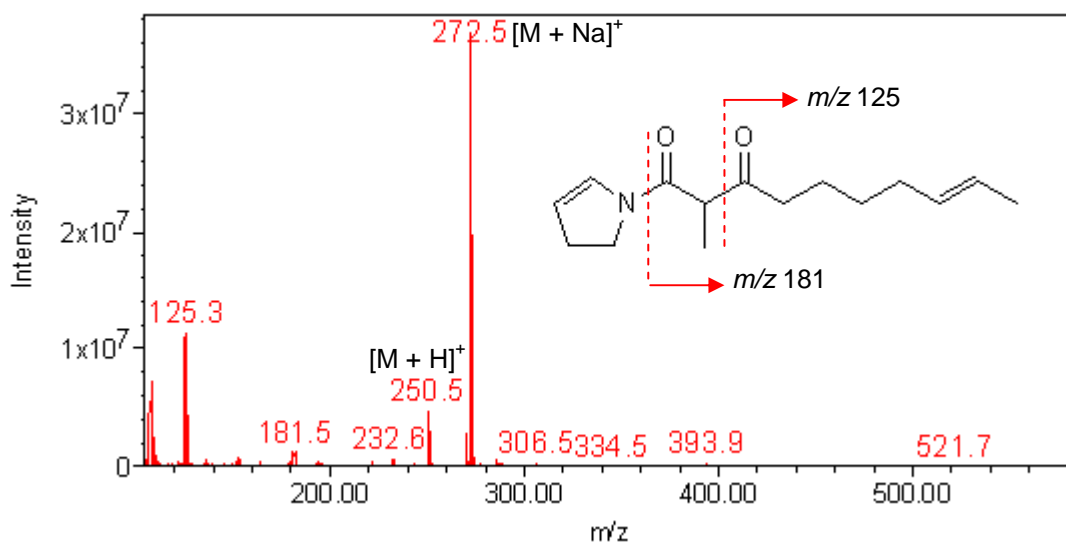


Figura 37 – Proposta de fragmentação para a amostra F53OT-3-P8.

Frações – **F53OT-3-P9** e **F53OT-4-P2**

Estas amostras foram analisadas por CLAE-UV-EM, e não apresentaram um bom grau de pureza. Os espectros de absorção na região do UV e de massas foram os seguintes:

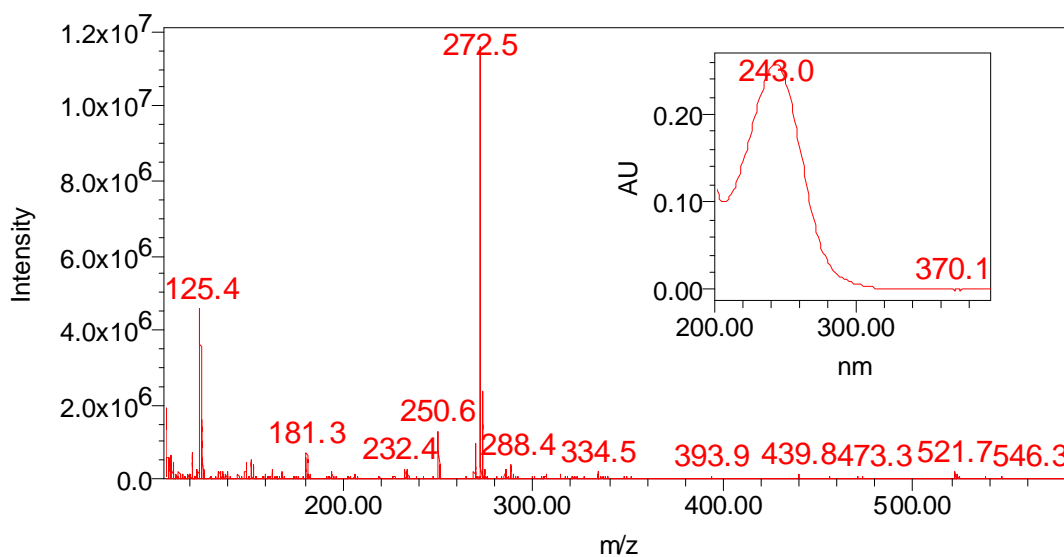


Figura 38 – Espectros de absorção na região do UV e de massas obtidos para as amostras **F53OT-3-P9** e **F53OT-4-P2**. Condições de ionização: ionização por SE⁺ e cone com voltagem de 25 V.

As análises dos espectros de absorção na região do UV e dos fragmentos do espectro de massas, obtidos para as amostras F53OT-3-P9 e F53OT-4-P2 (figura 38), indicam que o composto identificado nestas, é um possível isômero de **56**, pois os tempos de retenção são diferentes. Esta amostra necessitaria de uma repurificação mas a quantidade de material, 2,8 mg, tornou inviável esta separação.

Frações – **F53OT-3-P10** e **F53OT-4-P3**

Esta amostra foi analisada por CLAE-UV-EM, e apresentou um bom grau de pureza. Os espectros de absorção na região do UV e de massas foram os seguintes:

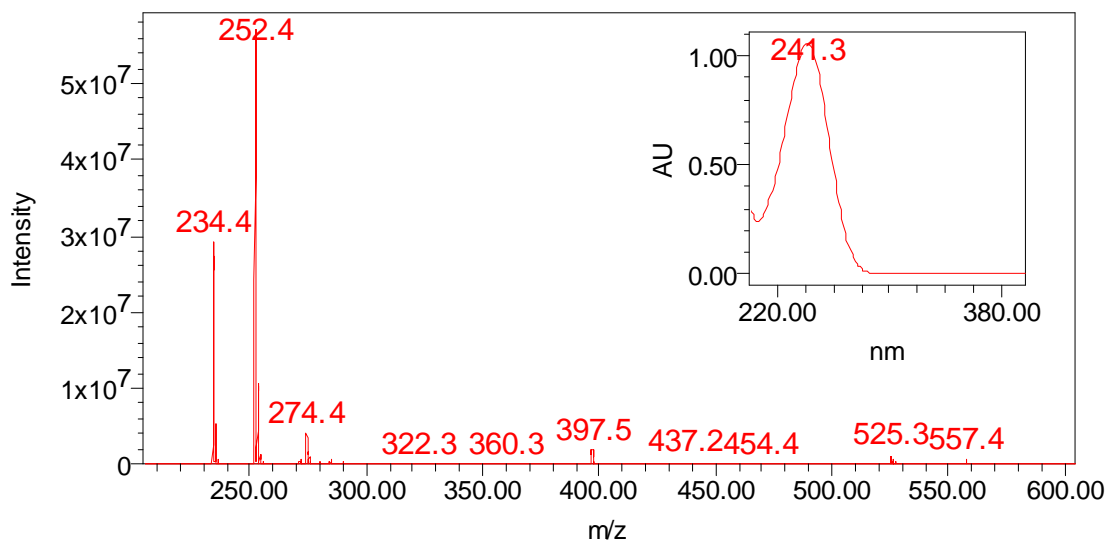
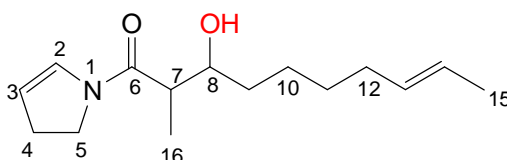


Figura 39 – Espectros de absorção na região do UV e de massas obtidos para as amostras **F53OT-3-P10** e **F53OT-4-P3**. Condições de ionização: modo de ionização por SE^+ e cone com voltagem de 25 V.

As análises dos espectros de absorção na região do UV e dos fragmentos do espectro de massas, para as amostras **F53OT-3-P10** e **F53OT-4-P3** (figura 39), indicam que o composto identificado em ambas, é um possível análogo de **56**. Comparando o espectro dos fragmentos de massas de **56** (figura 34) com o espectro dos fragmentos de massas da figura 39 (amostras **F53OT-3-P10** e **F53OT-4-P3**), pode-se observar uma ligeira diferença nas fragmentações. Para a amostra **56** verificou-se os íons em m/z 272 e 250; e os fragmentos em m/z 181 e 125. Para as amostras **F53OT-3-P10** e **F53OT-4-P3** foram observados íons em m/z 274 e 252; e o fragmento em m/z 234. Com base nestas diferenças de fragmentações propôs-se a seguinte estrutura para as amostras **F53OT-3-P10** e **F53OT-4-P3** (**57**).



(57) Proposta de estrutura química para a amostra **F53OT-3-P10** e **F53OT-4-P3**

A diferença, estrutural, de **56** para **57** é a substituição do grupo carbolina do carbono 8 (em **56**) por um grupo hidroxila (destacada em vermelho em **57**). Esta

alteração vai modificar a fragmentação deste possível composto. A proposta para uma possível fragmentação de **57** esta representada na figura 40.

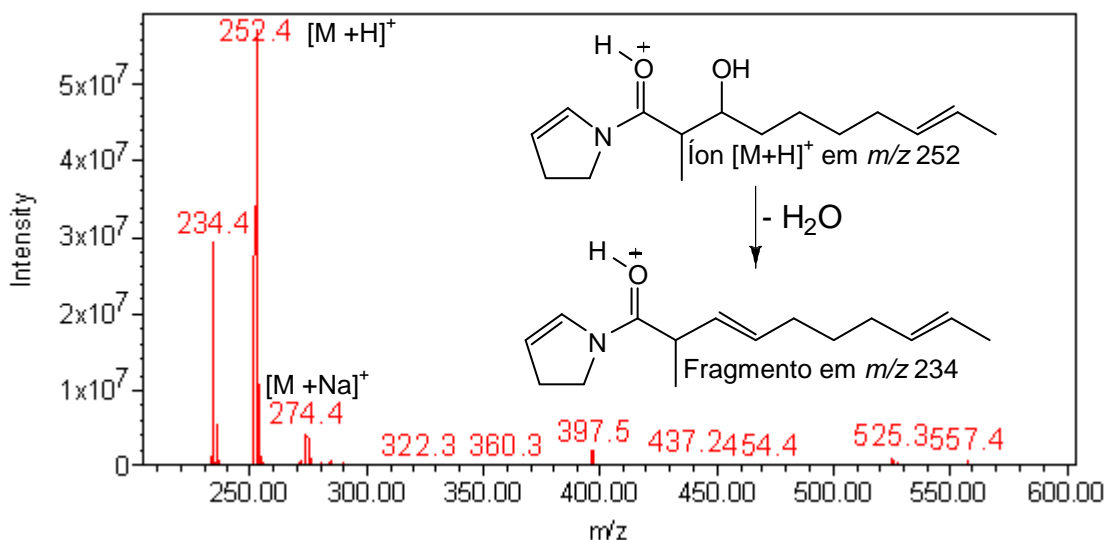


Figura 40 – Proposta de possível fragmentação para **57**.

Esta amostra, também, necessitaria de uma repurificação, e a quantidade de material (3,5 mg), mostrou ser insuficiente para se obter uma quantidade de composto puro que possibilite a realização de posteriores análises espectroscópicas para sua estrutura química ser elucidada.

Frações – **F53OT-3-P11** e **F53OT-4-P4**

Esta amostra foi analisada por CLAE-UV-EM, e também apresentou bom grau de pureza. Os espectros de absorção na região do UV e de massas foram os seguintes:

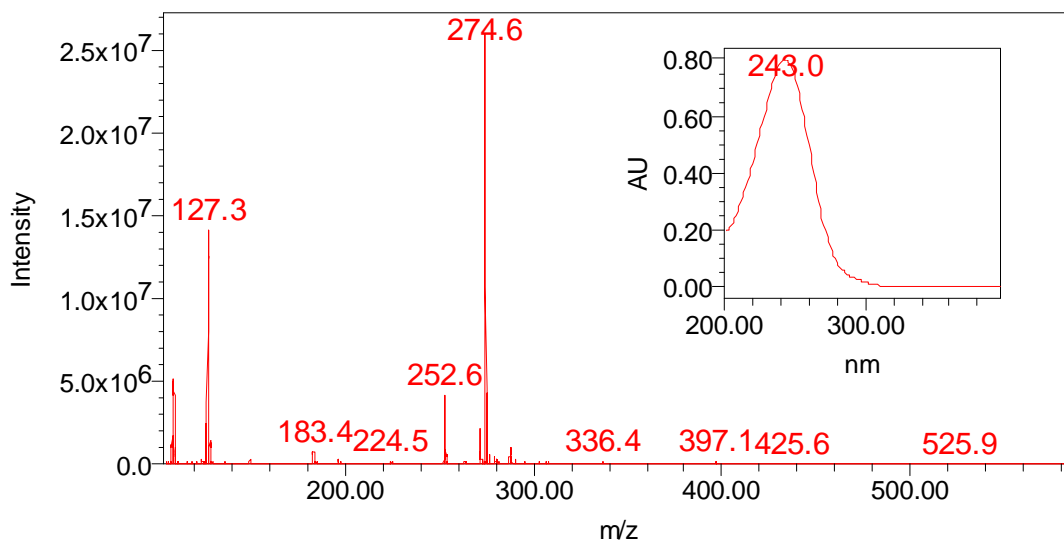
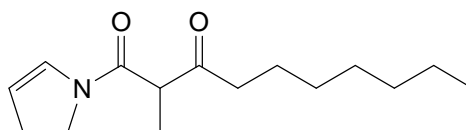


Figura 41 – Espectros de absorção na região do UV e de massas obtidos para as amostras **F53OT-3-P11** e **F53OT-4-P4**. Condições de ionização: modo de ionização por SE^+ e cone com voltagem de 25 V.

A análise do espectro de absorção na região do UV (figura 41), indica apenas uma banda de absorção em 243 nm. A análise dos fragmentos do espectro de massas apresentou um íon em m/z 252, como pico do íon quasi-molecular $[M + H]^+$, e um outro íon em m/z 274, foi atribuído à molécula cationizada com átomo de sódio, $[M + Na]^+$. Uma busca na literatura indicou o composto **58**, isolado em 1998 por MOYA e colaboradores, que possui características químicas semelhantes das obtidas para a amostra F53OT-3-P11.



(58) 1-(2,3-diidropirrol-1-il)-2-metildecano-1,3-diona

Esta substância possui 251 u.m.a., com pico do íon molecular $[M + H]^+$ em m/z 252, e apenas uma banda de absorção na região do UV em 243 nm. Para confirmar a estrutura da amostra F53OT-3-P11, esta foi enviada para serem realizadas análises de RMN de 1H e ^{13}C (respectivamente, figuras v2-19 e v2-20, volume 2). Após realizar as análises observou-se que estes apresentaram perfil de sinais de

deslocamento químico semelhantes dos observados para **56**. A tabela 27 indica os deslocamentos químicos de RMN-¹H e ¹³C obtidos para a amostra F53OT-3-P11 comparados com dados da literatura.

Tabela 27 – Dados dos deslocamentos químicos de RMN-¹H (400 MHz) e RMN-¹³C (100 MHz) obtidos em DMSO-*d*₆, para a amostra F53OT-3-P11, comparados com dados da literatura (MOYA et al., 1998) obtidos em solvente CDCl₃ para o composto **58**.

Posição	F53OT-3-P11	MOYA et al., 1998	F53OT-3-P11	MOYA et al., 1998
	δ (ppm) ¹³ C	δ (ppm) ¹³ C	δ (ppm) ¹ H (mult, integral)	δ (ppm) ¹ H (mult, integral)
2	129,3 e 128,6*	129,3 e 128,3	6,91 e 6,81* (m, 1H)	6,9 e 6,6 (m+m, 1H)
3	111,9 e 111,7*	113,1 e 111,6	5,31 e 5,32* (m, 1H)	5,3 (m, 1H)
4	27,6 e 29,5*	29,0	2,57 e 2,71* (m, 2H)	2,8 (m, 2H)
5	44,9 e 45,2*	45,5	3,69 e 3,69* (m, 2H)	3,9 (m, 2H)
6	166,1	165,6		
7	50,5 e 51,0*	53,3	3,96 e 3,87* (q, 1H)	3,5 e 3,6 (q+q, 1H)
8	206,3 e 206,5*	207,2		
9	39,9	39,3	2,41 (t, 2H)	2,4 (m, 2H)
10	22,9	23,5	1,42 (m, 2H)	1,6 (m, 2H)
11	28,2	28,1	1,20 (m, 2H)	1,2 (m, 2H)
12	28,3		1,20 (m, 2H)	1,2 (m, 2H)
13	31,0	31,7	1,21 (m, 2H)	1,2 (m, 2H)
14	21,9	22,6	1,21 (m, 2H)	1,2 (m, 2H)
15	13,8	14,1	0,85 (t, 3H)	0,9 (t, 3H)
16	12,6	13,1	1,14 (d, 3H)	1,4 (d, 3H)

*deslocamentos químicos do rotâmero minoritário

Com estes resultados foi confirmada que a estrutura química para a amostra F53OT-3-P11 é a do composto **58**. Assim como foi observado para a amostra F53OT-3-P8, a amostra F53OT-3-P11 também apresentou duas formas interconvertíveis de isômeros rotacionais em seu espectro de RMN-¹H (figura v2-19, volume 2).

Os autores que relataram o isolamento de **58** também não discutem a presença de dois rotâmeros para este composto.

Definida a estrutura química para a amostra F53OT-3-P11, a análise do seu espectro de massas indicou a fragmentação apresentada na figura 42.

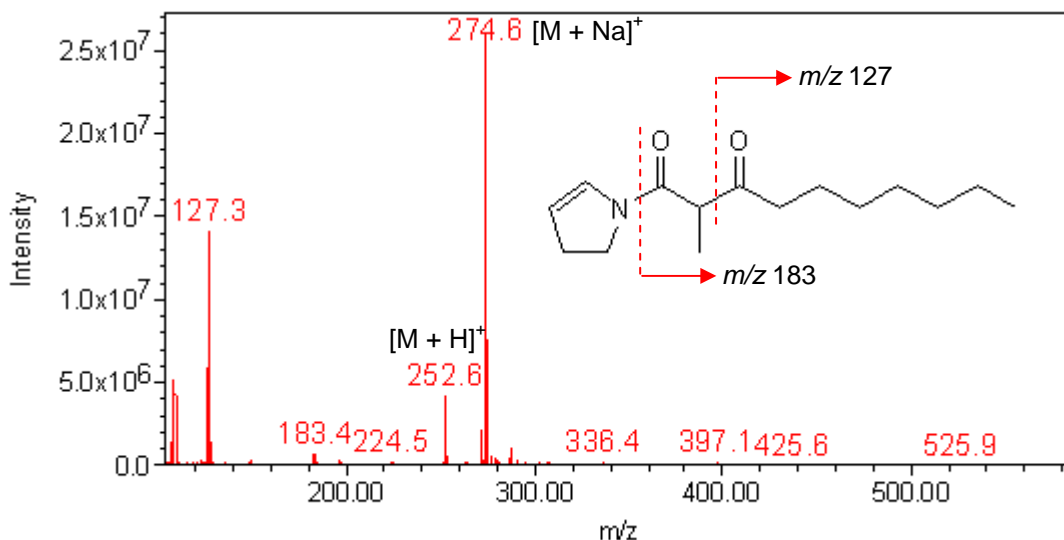


Figura 42 – Proposta de fragmentação para a amostra F53OT-3-P11.

4.2.5 Reunião das frações do PFF obtidas para *P. citrinum* e purificação da Fração 4

Quando foi realizado o planejamento fatorial fracionário (PFF) para as espécies de *Penicillium* estudadas, foram realizados 19 experimentos de crescimento (sendo 16 do planejamento fatorial e 3 pontos centrais, tabelas 1 e 2 página 32). Para cada experimento foram obtidas 4 frações da EFS (item 3.5). Estas frações, obtidas a partir destes 19 experimentos (realizados para *P. citrinum*) foram, então, reunidas por tipo de fração em 4 diferentes amostras: F53-F1 (Frações 1 da EFS), F53-F2 (Frações 2 da EFS), F53-F3 (Frações 3 da EFS) e F53-F4 (Frações 4 da EFS). Uma alíquota de cada amostra (1,0 mg) foi analisada por CLAE-UV-EM. A amostra F53-F4 apresentou um perfil cromatográfico interessante e, sendo assim, decidiu-se realizar uma purificação desta fração. A purificação da amostra F53-F4, por CLAE-UV, apresentou o seguinte perfil cromatográfico (figura 43).

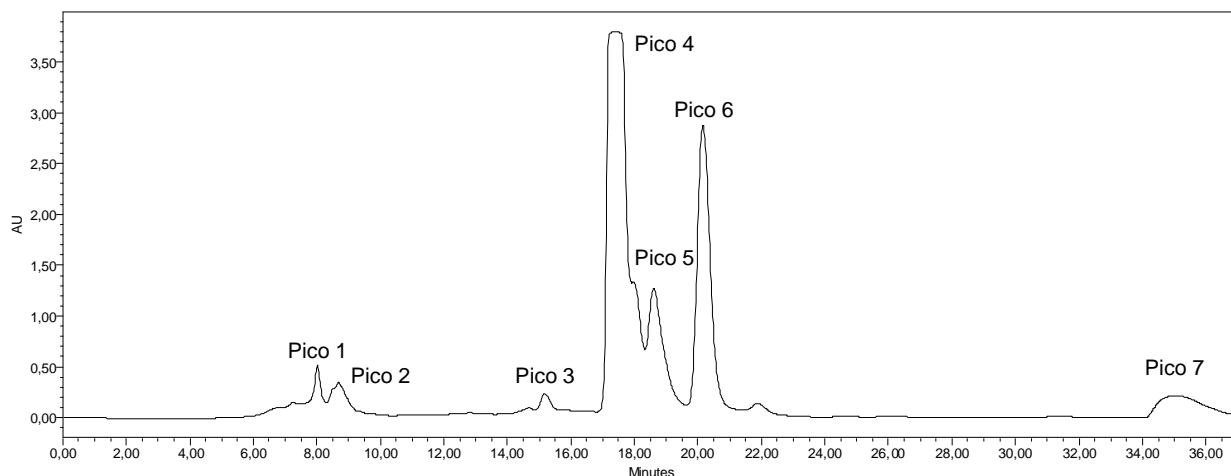


Figura 43 – Cromatograma utilizado para a purificação da fração 4 (MeOH 100%) da EFS obtida a partir da reunião dos experimentos do PFF realizado para *P. citrinum* (F53). Condições de análise: coluna analítica C₁₈ Inertsil ODS-3 (dimensões 250 x 4,6 mm; 5 µm) eluída com MeOH/H₂O 60:40 por 40 minutos com fluxo de 1 mL/minuto, monitorada em $\lambda = 254$ nm.

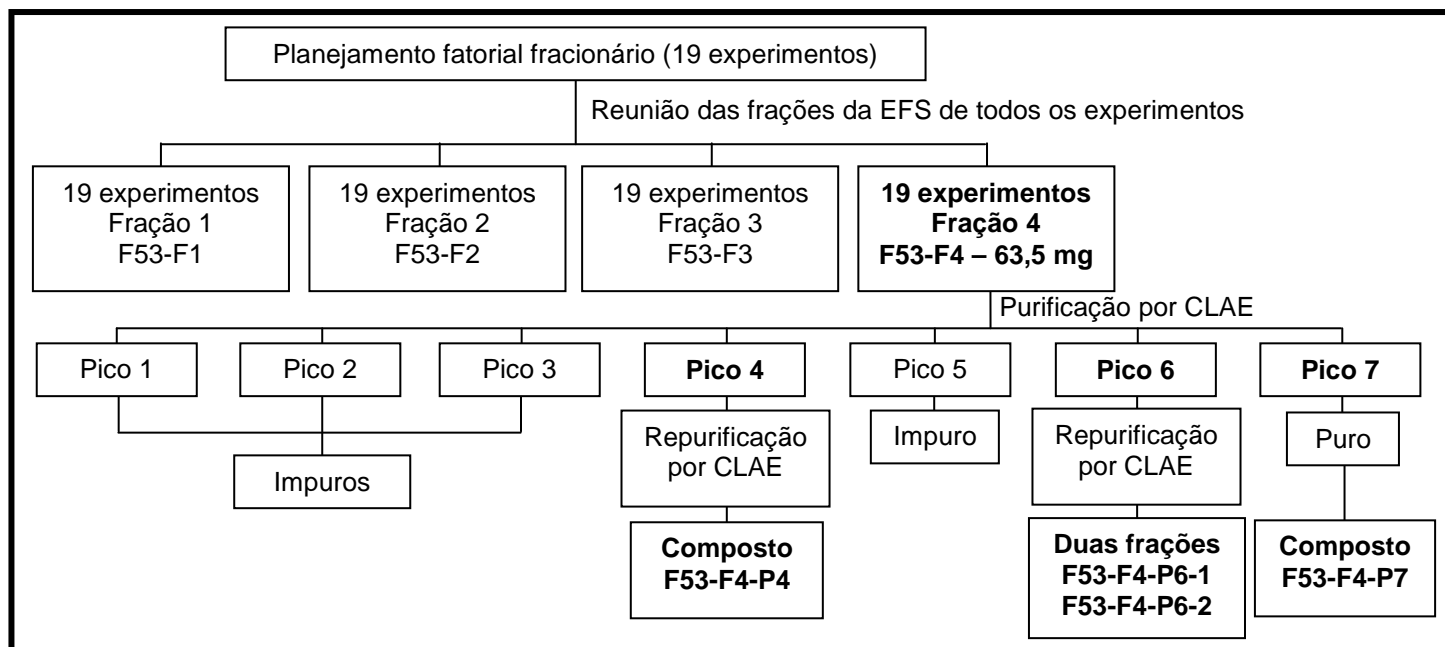
Após a separação e coleta dos compostos referentes aos picos 1 a 7, ilustrados no cromatograma da figura 43, estas frações foram evaporadas. As massas de cada um dos compostos foram as seguintes (tabela 28).

Tabela 28 – Frações obtidas após purificação por CLAE (cromatograma figura 43) da fração 4 da EFS obtida a partir da reunião das frações do PFF realizado para *P. citrinum*.

Picos	Código	Massa em mg
1	F53-F4-P1	3,3
2	F53-F4-P2	8,3
3	F53-F4-P3	3,4
4	F53-F4-P4	2,4
5	F53-F4-P5	6,1
6	F53-F4-P6	7,8
7	F53-F4-P7	1,5

Estas 7 amostras foram analisadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a um detector UV-Visível com arranjo de fotodiodos, também acoplado a um detector de espectrometria de massas (CLAE-UV-EM). As amostras 16, 17, 18 e 20 apresentaram muitas impurezas. As amostras 19 e 21 apresentaram um grau de pureza razoável e foram repurificadas. A amostra 22 apresentou um grau de pureza muito bom e, portanto não necessitou ser repurificada.

Todo este processo está simplificado no fluxograma representado no esquema 3.



Esquema 3 – Fluxograma ilustrando a reunião das frações e purificação da fração 4 da EFS obtida a partir dos experimentos de crescimento do PFF realizado para *P. citrinum*.

O resultado das análises por CLAE-UV-EM das amostras 19, 21 e 22 são descritas a seguir.

A amostra 19 – **F53-F4-P4**, com quantidade de 2,4 mg, foi repurificada e apresentou apenas um composto com os seguintes espectros de massas e UV.

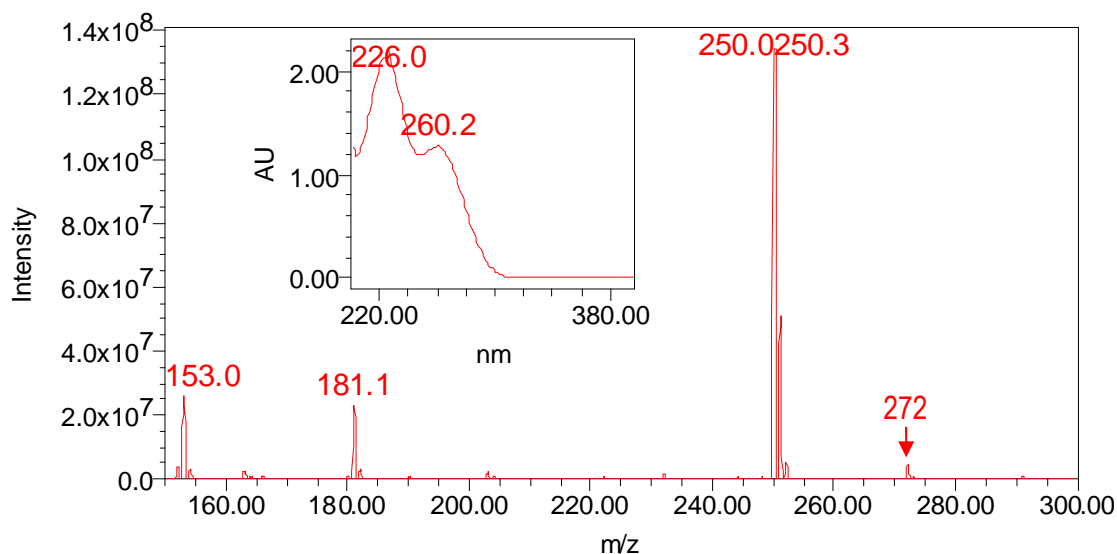
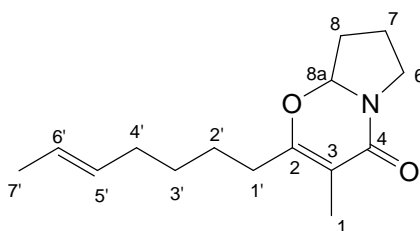


Figura 44 – Espectros de absorção na região do UV e de massas obtidos para a amostra **F53-F4-P4**. Condições de ionização: modo de ionização por SE^+ e cone com voltagem de 25 V.

A análise do espectro de absorção na região do UV da amostra F53-F4-P4 (figura 44), indicou a presença de duas bandas de absorção uma em 226 e outra em 260 nm. A análise do espectro de massas apresentou um íon em m/z 250, que pôde ser atribuído o pico do íon quasi-molecular $[M + H]^+$, e um outro íon, em m/z 272, que pôde ser atribuído à molécula cationizada com átomo de sódio, $[M + Na]^+$. Os dados indicam que foi isolado o composto (**59**), isolado em 1998 por CANTIN e colaboradores. Esta substância apresenta 249 u.m.a., com pico do íon quasi-molecular $[M + H]^+$ em m/z 250. Os autores citam que este composto foi obtido através de síntese (CANTIN, et al. 1998). Portanto, F53-F4-P4 provavelmente é um artefato de isolamento e não um produto natural.



(59) 2-((*E*)-hept-5-enil)-6,7,8,8a-tetraidro-3-metilpirrolo[2,1-b][1,3]oxazin-4-ona

Para confirmar a estrutura da amostra F53-F4-P4, esta foi enviada para serem realizadas análises de RMN de ^1H e ^{13}C .

A análise dos espectros de RMN- ^1H e ^{13}C (respectivamente, figuras v2-21 e v2-22, volume 2) da amostra F53-F4-P4 permitiu-nos construir a Tabela 29, e comparar os dados obtidos com os da literatura.

Tabela 29 – Dados dos deslocamentos químicos de RMN- ^1H (400 MHz) e RMN- ^{13}C (100 MHz) obtidos em DMSO- d_6 , para a amostra F53-F4-P4, comparados com dados da literatura (CANTIN *et al.*, 1999) obtidos em solvente CDCl_3 para o composto **59**.

Posição	F53F4-P4	CANTIN et al., 1999	F53F4-P4	CANTIN et al., 1999
	δ (ppm) ^{13}C	δ (ppm) ^{13}C	δ (ppm) ^1H (mult, integral)	δ (ppm) ^1H (mult, integral)
1	10,1	10,0	1,66 (s, 3H)	1,8 (s, 3H)
2	163,6	163,9	–	–
3	105,9	106,7	–	–
4	162,7	163,8	–	–
6	44,1	44,3	3,25 e 3,49 (m, 2H)	3,4 e 3,7 (m, 2H)
7	21,5	21,8	1,79 e 1,86 (m, 2H)	1,9 (m, 2H)
8	30,0	30,5	2,15 e 2,28 (m, 2H)	2,2 (m, 2H)
8a	87,7	87,7	5,21 (dd, 1H)	5,2 (dd, 1H)
1'	28,6	29,2	1,31 (m, 2H)	1,4 (m, 2H)
2'	26,0	26,3	1,44 (qui, 2H)	1,5 (m, 2H)
3'	31,3	31,8	2,28 (qui, 2H)	2,3 (m, 2H)
4'	31,9	32,2	1,95 (m, 2H)	2,0 (m, 2H)
5'	131,3	131,2	5,37 (m, 1H)	5,4 (m, 1H)
6'	125,0	125,3	5,37 (m, 1H)	5,4 (m, 1H)
7'	18,0	17,8	1,59 (dd, 3H)	1,6 (m, 3H)

Definida a estrutura química para a amostra F53-F4-P4, e com base nos fragmentos do espectro de massas, pôde-se propor a seguinte fragmentação para este composto (figura 45).

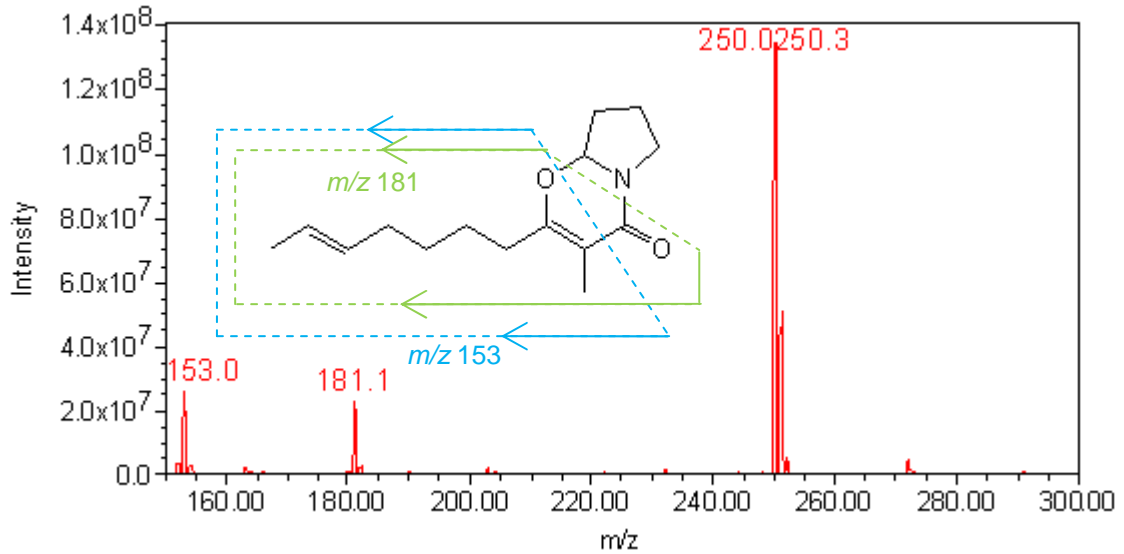


Figura 45 – Proposta de fragmentação para a amostra F53-F4-P4 (**59**).

Amostra 21 – F53-F4-P6 – quantidade de amostra 7,8 mg.

Esta amostra foi repurificada por CLAE e dois compostos foram isolados.

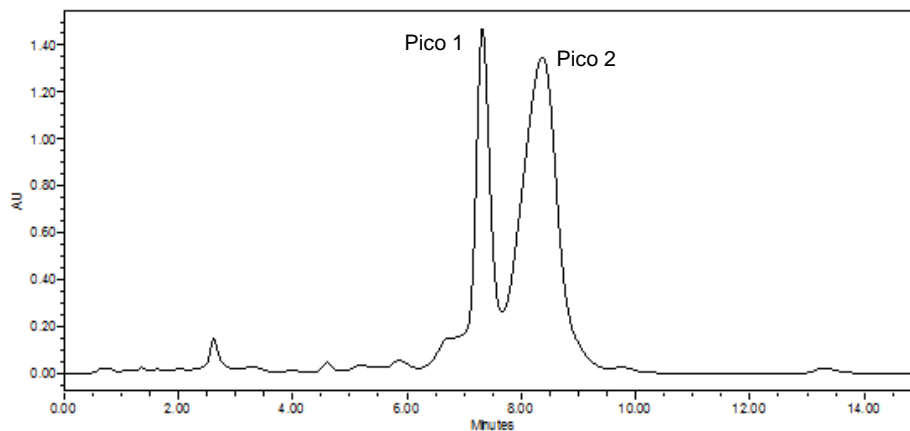


Figura 46 – Cromatograma utilizado para a separação da fração **F53-F4-P6**, obtida a partir da purificação da fração 4 da EFS dos experimentos de crescimento do PFF realizados para *P. citrinum*. Condições de análise: coluna analítica C₁₈ symmetry (dimensões 75 x 4,6 mm; 3,5 μm) eluída com MeOH/H₂O 70:30 por 15 minutos com fluxo de 0,7 mL/min. Monitorado em 254 nm.

Após a separação por CLAE-UV da amostra 21 (F53-F4-P6) estas frações foram evaporadas. As massas de cada uma das frações foram as seguintes:

Pico 1 – código **F53-F4-P6-1** (0,4 mg)

Pico 2 – código **F53-F4-P6-2** (0,6 mg)

Estas duas amostras foram analisadas por CLAE-UV-EM e os resultados foram os seguintes.

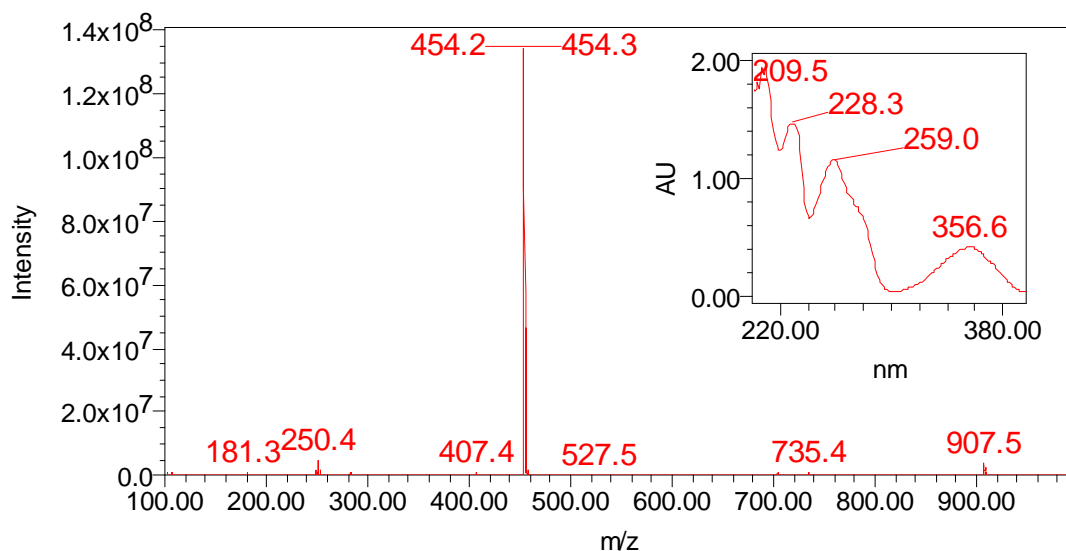


Figura 47 – Espectros de absorção na região do UV e de massas obtidos para a amostra F53-F4-P6-1. Condições de ionização: modo de ionização por SE^+ e cone com voltagem de 25 V.

A análise do espectro de absorção na região do UV, indicou a presença de 4 bandas de absorção: em 209, 228, 259 e 356 nm. A análise do espectro de massas indicou apenas um íon em m/z 454, que foi atribuído ao pico do íon quasi-molecular $[M + H]^+$. Através de uma vasta pesquisa na literatura nenhum composto que possui características físico-químicas semelhantes foi encontrado. A pouca quantidade de material obtida para esta amostra impossibilitou, em um primeiro momento, a realização de análises espectroscópicas. Análises posteriores realizadas em outras frações de *P. citrinum* (F53-F4-P7, figura 49 página 130 e F53OTAI-2-P1, figura 56 página 151) apresentaram espectros de absorção na região do UV e de massas muito parecidos com os observados para a amostra F53-F4-P6-1. A purificação da fração F53-F4-P7 resultou no isolamento do composto **60** (página 138) nomeado **citriinalina A**, e a purificação da amostra F53OTAI-2-P1 proporcionou o isolamento

de seu isômero a **citrinalina B (62)**. Foi realizada uma injeção em CLAE-UV-EM destes compostos, e, posteriormente, comparou-se os tempos de retenção da amostra F53-F4-P6-1 com os das citrinalinas A e B. Observou-se nos resultados que a amostra F53-F4-P6 -1 é a citrinalina B.

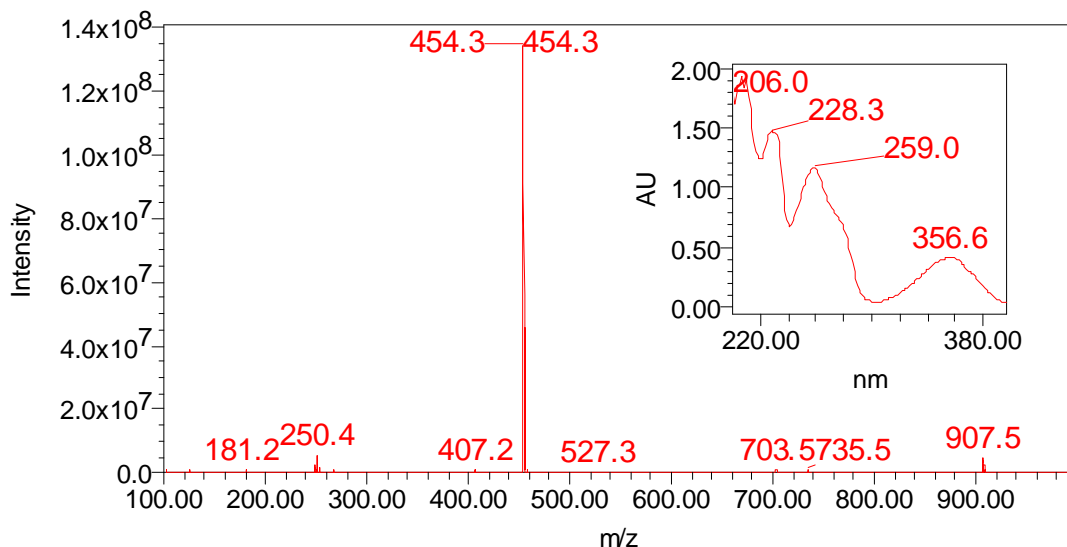


Figura 48 – Espectros de absorção na região do UV e de massas obtidos para a amostra F53-F4-P6-2. Condições de ionização: modo de ionização por SE⁺ e cone com voltagem de 25 V.

A análise do espectro de absorção na região do UV e do espectro de massas da amostra F53-F4-P6-2 (figura 48), observou-se a semelhança destes resultados com os encontrados para a amostra F53-F4-P6-1 (figura 47). Como houve diferença apenas no tempo de retenção da amostra F53-F4-P6-1 para F53-F4-P6-2. Nos resultados de comparação dos tempos de retenção observou-se que a amostra F53-F4-P6-2 é a citrinalina A.

A amostra **F53-F4-P7** (1,5 mg) apresentou um grau de pureza muito bom e após a análise por CLAE-UV-EM os resultados obtidos foram.

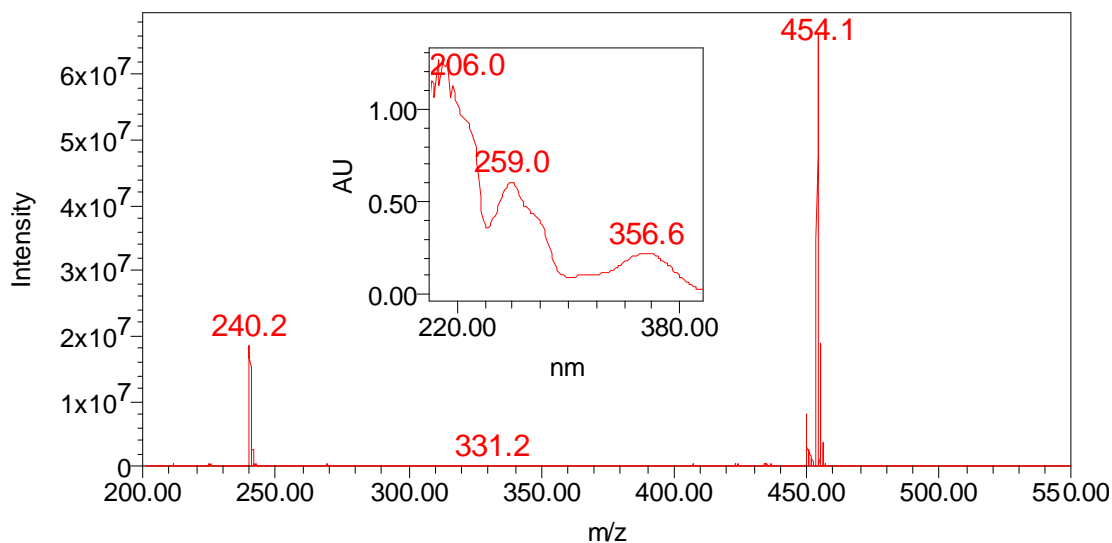


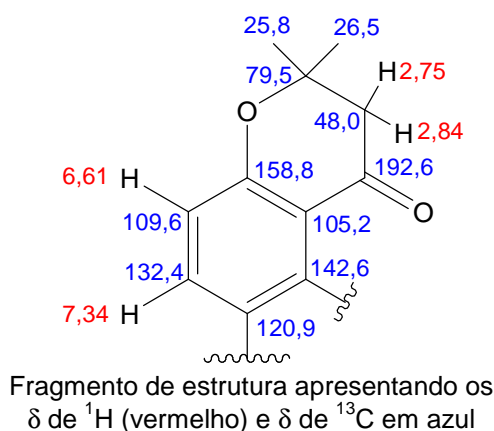
Figura 49 – Espectros de absorção na região do UV e de massas obtidos para a amostra F53OT-4-P7. Condições de ionização: modo de ionização por SE^+ e cone com voltagem de 25 V.

A análise do espectro de absorção na região do UV, e do espectro de massas da amostra F53-F4-P7 (figura 49), observa-se, também, uma semelhança das características físico-químicas observadas para este composto com aqueles isolados da amostra F53-F4-P6 (figuras 47 e 48).

Com o intuito de elucidarmos a estrutura química da amostra F53-F4-P7, esta foi enviada para o Canadá para serem realizadas análises espectroscópicas de RMN em aparelho de 600 MHz com criosonda.

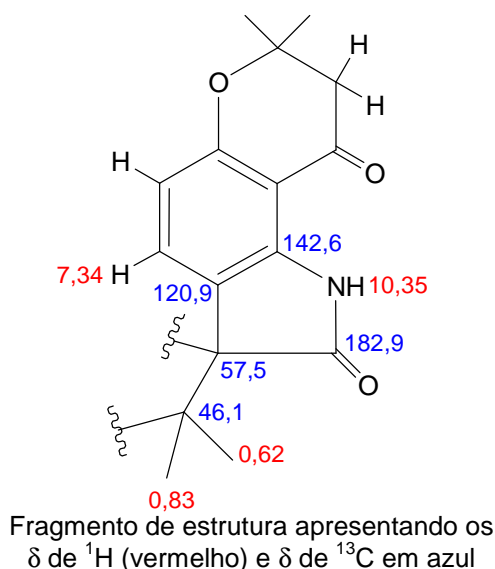
A análise por espectrometria de massas de alta resolução indicou um íon $[M + H]^+$ em m/z 454,2342, que corresponde a fórmula molecular $C_{25}H_{31}N_3O_5$ exigindo 12 graus de insaturação nesta molécula. As análises dos espectros de RMN- 1H e ^{13}C (respectivamente, figuras **v2-23 a-e** e **v2-24 a-b**, volume 2) e HSQC (figura **v2-25 a-b**, volume 2) mostraram que este composto possui dois grupos carbonila, quatro carbonos quaternários sp^3 , dois grupos metínicos sp^2 , quatro carbonos quaternários sp^2 , dois grupos metínicos sp^3 , seis metilênicos e quatro metilas. A presença de um benzeno 1,2,3,4-tetrasubstituído foi verificada a partir da análise dos espectros de COSY e HMBC (respectivamente, figuras **v2-26 a-b** e **v2-27 a-e**, volume 2). As

correlações COSY observadas entre os hidrogênios metínicos sp^2 em δ 6,61 (^{13}C δ 109,6) e em δ 7,34 (^{13}C δ 132,4) foi atribuído a um acoplamento orto ($J = 8,3$ Hz). Ambos hidrogênios aromáticos em δ 6,61 e δ 7,34 mostraram correlações de longa distância (CLD) no espectro HMBC com os carbonos aromáticos em δ 158,8 e em δ 105,2 o hidrogênio em δ 6,61 apresentou uma CLD com o carbono aromático em δ 120,9, e o hidrogênio em δ 7,34 apresentou um acoplamento 3J com o carbono aromático em δ 142,6. A presença de um fragmento isopentano oxidado ligado aos carbonos em δ 105,2 e 158,8 foi deduzida como se segue. O hidrogênio em δ 6,61 apresentou uma CLD com o grupo carbonila em δ 192,6. Um grupo metilênico representado por um sistema AB em δ 2,84 e 2,75 também mostrou uma CLD com este mesmo grupo carbonila, bem como uma CLD com o carbono aromático em δ 105,2, com o carbono quaternário sp^3 substituído por oxigênio em δ 79,3 e com os grupos metila em δ 25,8 e 26,5. Tanto os grupos metila como o metileno em δ 2,84 e 2,75 (δ 48,0) apresentaram CLDs com o carbono sp^3 quaternário com δ 79,5. Essas correlações nos permitiu estabelecer a presença de um grupo $-O-C(Me)_2-CH_2-CO$ ligado ao resíduo de benzeno tal como indicado a seguir.



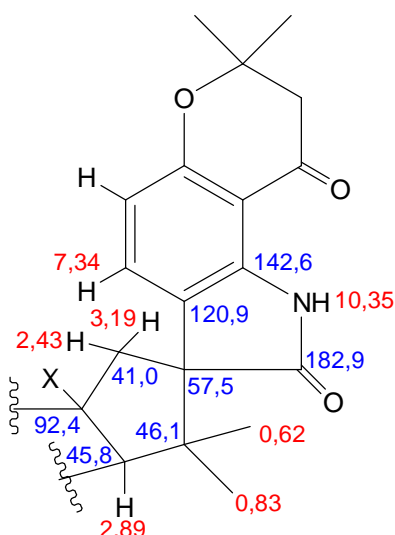
Um grupo amida NH também mostrou estar ligado ao benzeno, uma vez que seu hidrogênio (δ 10,35) apresentou uma CLD com os carbonos aromáticos em δ

142,6 e 120,9, bem como com um grupo carbonila em δ 182,9 (espectro NHSQC figura **v2-25 c**, volume 2). A presença de um carbono do tipo spiro quaternário sp^3 (δ 57,5) ligado ao grupo carbonila da amida e ao carbono aromático em δ 120,9 foi deduzida através da observação de CLD entre o carbono spiro em δ 57,5 e o hidrogênio da amida em δ 10,35, bem como com o hidrogênio em δ 7,34, com dois grupos metílicos em δ 0,62 e δ 0,83, e com um hidrogênio de um grupo metilênico em δ 3,19. Desta forma, foi possível montar um fragmento do tipo 7,7-dimetil-7,8-dihidropirano[2,3-g]indol-2,9(1H,3H)-diona.



A análise do espectro HMBC indicou que ambos grupos metila em δ 0,83 e 0,62, apresentam CLD com o carbono quaternário em δ 46,1. Vicinal a este carbono quaternário observa-se um grupo metínico, uma vez que o hidrogênio deste (δ 2,89) apresentou CLD com o carbono em δ 46,1. Esse carbono quaternário também apresentou uma CLD com o hidrogênio em δ 3,19, um dos dois hidrogênios de um grupo metileno, que também apresentou uma CLD com o carbono aromático em δ 120,9, com um carbono quaternário em δ 92,4 e com o metino em δ 45,8. Essas correlações indicaram a presença de um anel de ciclopentano, composto por um

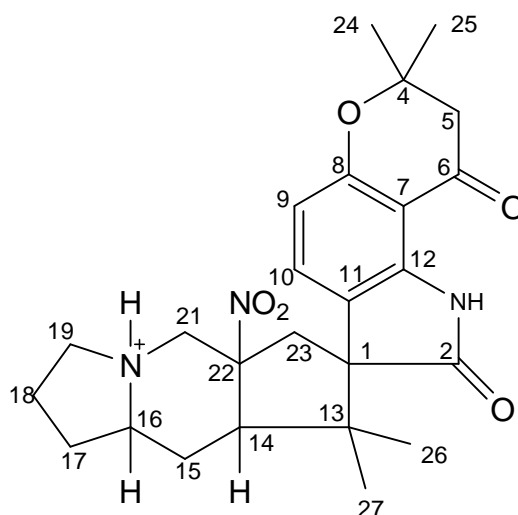
carbono sp^3 quaternário (δ 46,1), substituído por dois grupos metila (δ 0,83 e δ 0,62), um carbono quaternário spiro sp^3 (δ 57,5), um grupo metilênico (δ 41,0), um carbono quaternário substituído por um heteroátomo (δ 92,4) e um grupo metínico (δ 45,8). Até este ponto, a análise do espectro COSY foi pouco informativa, uma vez que correlações 1H - 1H geminais só foram observadas para os pares de metileno AB em δ 2,84 e 2,75 e AB em δ 3,19 e 2,43, e uma correlação vicinal foi observada entre os dois hidrogênios aromáticos em δ 6,61 e 7,34.



Fragmento de estrutura apresentando os δ de 1H (vermelho) e δ de ^{13}C em azul

A análise do espectro COSY provou ser útil para estabelecer a presença de um sistema de spin a partir do metino em δ 2,89 ligado a um grupo metileno em δ 2,39 e 1,88, por sua vez ligado em sequência com um metino em δ 4,19. Este metino mostrou estar acoplado a outro metileno em δ 2,24 e 1,93, sequencialmente ligado a outro metileno em, δ 2,19 e 2,05, finalmente ligado a um terceiro metileno em δ 3,50 e 3,24. Este último metileno apresentou um acoplamento 1H - 1H com um hidrogênio ligado a um heteroátomo em δ 9,80 (NH). A análise do espectro HMBC confirmou a presença do sistema de spin entre o metino em δ 45,8 com o metileno em δ 55,5.

Após as análises dos espectros COSY e HMBC, restaram elementos estruturais correspondentes a um grupo MeNO₂. Os espectros de COSY e HMBC indicaram a presença de um grupo metileno em δ 4,19 e 3,53, entre o heteroátomo com ¹H em δ 9,80 e o carbono quaternário em δ 92,4. O próton em δ 9,80 apresentou CLD com o metileno em δ 55,4. Além disso, os deslocamentos químicos dos grupos metínicos em δ 61,1, metileno em δ 55,5 e metileno em δ 55,4 indicam a presença de um nitrogênio protonado entre esses grupos, contendo o ¹H em δ 9,80. Sobrando um grupo NO₂, este foi posicionado ligado ao carbono quaternário em δ 92,4. Portanto, a estrutura planar, IUPAC, do composto foi estabelecida como sendo 7',7',8,8-tetrametil-5a-nitro-1,2,3,5,5a,6,7',8,8a,8',9,9a-dodecaidro-1'H-spiro[ciclopenta[f]indolizina-7,3'-pirano[2,3-g]indolo]-2',9'-diona).



Estrutura planar para o composto F53-F4-P7

A estereoquímica relativa do composto foi estabelecida pela análise do seu espectro de RMN-¹H (figura **v2-23 a-e**, volume 2) e tROESY (figura **v2-28 a-b**, volume 2). No espectro de RMN-¹H, H-14 aparece como um dd ($J = 14,0$ e $3,5$ Hz), enquanto H-15a como um ddd ($J = 14,0; 14,0$ e $6,1$ Hz) e H-15b como um dd ($14,0$ e

3,5 Hz). Portanto, H-14 e H-15a tem uma relação *trans*-diaxial, enquanto H-14 e H-15b uma relação *cis*-axial/equatorial, partindo do princípio de que o anel central de seis membros apresenta uma conformação cadeira, em que H-14, NH-20, e o grupo nitro se encontram em orientação axial. Essa hipótese foi confirmada pela observação de efeitos NOE entre H-14 (axial) e Me-26 (na orientação equatorial), H-17a (δ 2,24) e H-21b (δ 3,53, axial), bem como entre H-17a e H-21b. Outra correlação NOE foi observada entre H-21b e H-23b.

Conseqüentemente, os prótons H-14, H-15b, H-17a, H-19b, H-21b, H-23b e Me-26 encontram-se na mesma face do sistema decahidro-1*H*-ciclopenta[*f*]indolizina. Por outro lado, Me-27 (δ 0,63) apresentou efeito NOE com H-15a (δ 2,39, axial) e H-23a (δ 3,19); este último próton apresentou um acoplamento dipolar com H-10 (δ 7,35). Outros acoplamentos do tipo NOE observados para H-15, H-16, H-17b, H-19a, H-21a e o próton NH deram apoio adicional para estabelecer a estereoquímica do composto (Figura 50). A análise do espectro de tROESY nos permitiu estabelecer a configuração relativa para este composto como sendo, 1*S* *, 14*R* *, 16*S* *, 22*S* *.

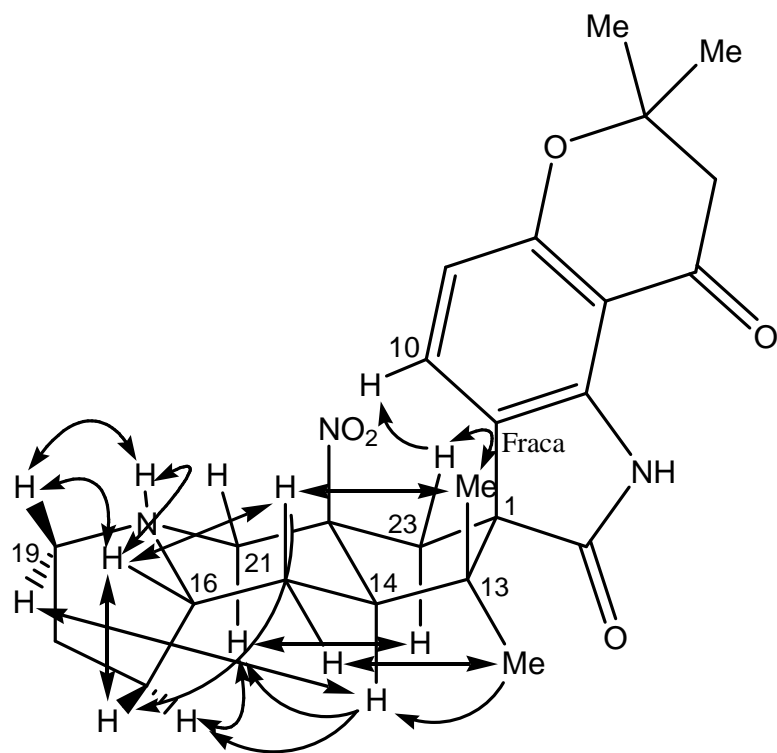
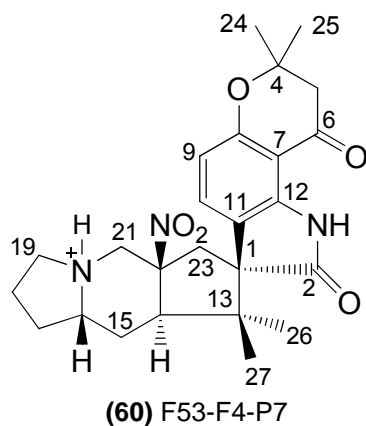


Figura 50 – Efeitos NOE observados para o composto F53-F4-P7.

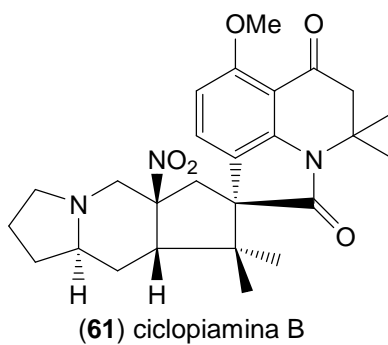
Tabela 30 – Dados dos deslocamentos químicos de RMN-¹H (600 MHz) e RMN-¹³C (150 MHz) em DMSO-*d*₆ obtidos para a amostra F53-F4-P7.

F53-F4-P7		
Posição	δ_C , mult. (δ_N)	δ_H (J in Hz)
1	57.5, C	
2	182.9, C	
3	(- 242.1), NH	10.35, s
4	79.3, C	
5	48.0, CH ₂	2.84, d (16.6) 2.75, d (16.6)
6	192.6, C	
7	105.2, C	
8	158.8, C	
9	109.6, CH	6.61, d (8.3)
10	132.4, CH	7.34, d (8.3)
11	120.9, C	
12	142.6, C	
13	46.1, C	
14	45.8, CH	2.89, dd (14.0, 3.5)
15	19.8, CH ₂	2.39, ddd (14.0, 14.0, 6.1) 1.88, dd (14.0, 3.5)
16	61.1, CH	4.19 nd
17	26.1, CH ₂	2.24, m 1.93, m
18	20.0, CH ₂	2.19, m 2.05, m
19	55.5, CH ₂	3.50 nd 3.24, m
20	(-316.7), NH	9.41, bs 4.19 nd
21	55.4, CH ₂	3.53, dd (14.0, 10.9)
22	92.4, C	
23	41.0, CH ₂	3.19, d (16.3) 2.43, d (16.3)
24	25.8, CH ₃	1.38, s
25	26.5, CH ₃	1.41, s
26	20.3, CH ₃	0.62, s
27	23.4, CH ₃	0.83, s

Após a análise dos espectros de RMN mono e bidimensionais, para a amostra F53-F4-P7, sua estrutura foi definida como sendo a indicada a seguir **60**.



A estrutura deste alcalóide indólico é inédita na literatura sendo similar à da ciclopiamina B (61) (BOND, et al., 1979).



O composto isolado a partir da amostra F53-F4-P7 foi então, por nós nomeado de citrinalina A.

A tabela 31 inclui a comparação dos deslocamentos químicos de ^1H da citrinalina A (60) e da ciclopiamina B (61).

Tabela 31 – Dados dos deslocamentos químicos de RMN-¹H (600 MHz) em DMSO-*d*₆ para a citrinalina A (**60**) comparados com os dados da ciclopamina B (**61**) (BOND *et al.*, 1979 em solvente CDCl₃).

	Citrinalina A	BOND et al., 1979
Posição	δ (ppm) ¹H (mult, integral)	δ (ppm) ¹H (mult, integral)
1	–	–
2	–	–
3	10.35, s	–
4	–	–
5	2.84, d (16.6) 2.75, d (16.6)	2,80 (d, 1H) e 2,50 (d, 1H)
6	–	–
7	–	–
8	–	–
9	6.61, d (8.3)	7,22 (d, 1H)
10	7.34, d (8.3)	6,48 (d, 1H)
11	–	–
12	–	–
13	–	–
14	2.89, dd (14.0, 3.5)	–
15	2.39, ddd (14.0, 14.0, 6.1) 1.88, dd (14.0, 3.5)	Não atribuído
16	4.19 nd	Não atribuído
17	2.24 , m 1.93, m	Não atribuído
18	2.19, m 2.05, m	Não atribuído
19	3.50 nd 3.24, m	Não atribuído
20	9.41, bs	–
21	4.19 nd 3.53, dd (14.0, 10.9)	Não atribuído
22	–	–
23	3.19, d (16.3) 2.43, d (16.3)	2.92 (d, 1H) e 2.40 (d, 1H)
24	1.38, s	1,40 (s, 3H)
25	1.41, s	1,71 (s, 3H)
26	0.62, s	3,91 (s, 3H)
27	0.83, s	1,04 (s, 3H)
28	–	0,90 (s, 3H)

Com a descoberta desse novo alcalóide indólico, a citrinalina A (**60**), um novo direcionamento na pesquisa foi tomado. Com a finalidade de proporcionar o isolamento de uma maior quantidade deste composto, para fins de estudos de atividade biológica, foi realizada uma otimização para a produção deste alcalóide por *P. citrinum*. O procedimento de otimização utilizado para este composto foi similar ao realizado para a otimização da produção de metabólitos secundários por *P. citrinum*.

No início do trabalho de otimização foi realizado um Planejamento Fatorial Fracionário (PFF) com a realização de 16 diferentes experimentos contendo 3 pontos centrais (etapa descrita no item 3.5). Os resultados das análises cromatográficas destes experimentos foram restaurados. Estes cromatogramas foram analisados com o intuito de se encontrar pico(s) que possuísem um perfil de absorção na região do UV com características semelhantes as do espectro de UV obtido para a citrinalina A. Após realizar estas análises, foram verificados dois picos com espectros de absorção na região do UV semelhantes ao da citrinalina. Novas análises multivariadas foram realizadas utilizando-se as áreas destes picos (figura 51).

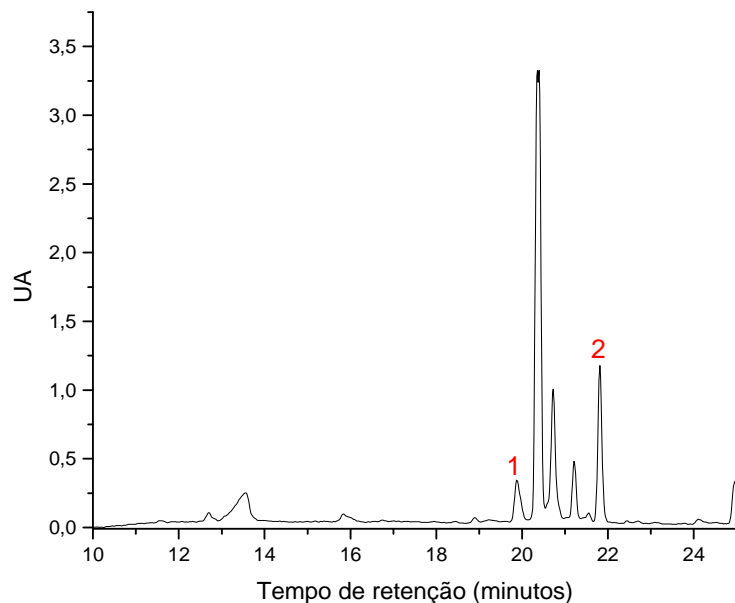


Figura 51 – Cromatograma contendo dois picos com perfis semelhantes ao da citrinalina. Pico (1) com $t_R = 19,9$ minutos e pico (2) com $t_R = 21,9$ minutos. Condições experimentais: coluna de fase reversa C₁₈ Synergi Fusion-RP 80 da marca Phenomenex[®], de dimensões 250 x 4,6 mm com 4 μ m de tamanho de partícula com um gradiente de MeOH/H₂O por 40 minutos, monitorados em comprimento de onda de 230nm.

Estas análises foram análogas às descritas no item 3.5, com apenas uma alteração. Anteriormente foram realizados cálculos com base na área de um intervalo do cromatograma (de 10 a 25 minutos). Para a otimização da produção da citrinalina A foram realizados cálculos com base nas áreas dos dois picos (pico 1 com 19,9 minutos e pico 2 com 21,9 minutos), separadamente, com absorção no UV praticamente idênticas ao composto 60. Após realizar os cálculos das integrais das áreas dos picos, os resultados obtidos foram os seguintes:

Tabela 32 – Planejamento Fatorial Fracionário contendo as áreas dos picos que possuem perfis de absorção na região do UV semelhantes ao da citrinalina A.

Exp.	% sais	% nutrientes	Dias	pH	Temperatura	Área do pico t_R 19,9 min	Área do pico t_R 21,9 min
1	80	60	28	8	30	0,024	0,262
2	20	60	28	8	15	0,025	0,111
3	80	10	28	8	15	0,019	0,195
4	20	10	28	8	30	0	0
5	80	60	14	8	15	0,018	0,052
6	20	60	14	8	30	0,043	0,303
7	80	10	14	8	30	0,010	0,097
8	20	10	14	8	15	0	0,076
9	80	60	28	6	15	0,031	0,095
10	20	60	28	6	30	0,029	2,144
11	80	10	28	6	30	0	0
12	20	10	28	6	15	0,011	0,848
13	80	60	14	6	30	0,028	0,227
14	20	60	14	6	15	0,002	0,016
15	80	10	14	6	15	0	0,005
16	20	10	14	6	30	0,022	1,143
17	50	35	21	7	23	0,011	0,378
18	50	35	21	7	23	0,074	0,509
19	50	35	21	7	23	0	0

Analisando-se os resultados das áreas obtidas para o pico com t_R em 19,9 minutos apresentados na tabela 32, observou-se que as áreas obtidas para este pico foram baixas. Este composto é produzido em pequena quantidade por *P. citrinum*. O experimento 6 do PFF foi o que apresentou melhor resultado para este composto. Já para as áreas obtidas para o pico com t_R em 21,9 minutos, observou-se que os experimentos 4 e 11 do PFF, não apresentaram área para o referido pico; no entanto o experimento 10 apresentou a maior área para este pico.

Após realizar todos os cálculos de interação de 1ª e 2ª ordem das variáveis (cálculos explicados nos itens 3.5.1 e 3.5.2), para as áreas destes dois picos com perfis semelhantes ao da citrinalina A, encontramos os seguintes resultados (tabela 33).

Tabela 33 – Efeito das interações de 1ª e 2ª ordem para as áreas dos picos que possuem perfis semelhantes ao da citrinalina A.

Interações	Pico t_R 19,9 min	Pico t_R 21,9 min
Ea	0,000	-0,463
Eb	0,017	0,106
Ec	0,002	0,217
Ed	0,002	-0,423
Ee	0,006	0,347
Eab	0,001	-0,021
Eac	0,002	-0,174
Ead	0,001	0,493
Eae	-0,008	-0,287
Ebc	0,002	0,287
Ebd	0,003	-0,016
Ebe	0,006	0,318
Ecd	-0,003	-0,207
Ece	-0,015	-0,058
Ede	-0,003	-0,290

Com os resultados de interações de 1ª e 2ª ordem obtidos para cada um dos picos (tabela 33), os gráficos de probabilidade foram construídos para ambos picos cromatográficos. Os resultados são apresentados nos gráficos das figuras 52 e 53. O procedimento utilizado para a análise destes gráficos está descrito no item 3.5.3.

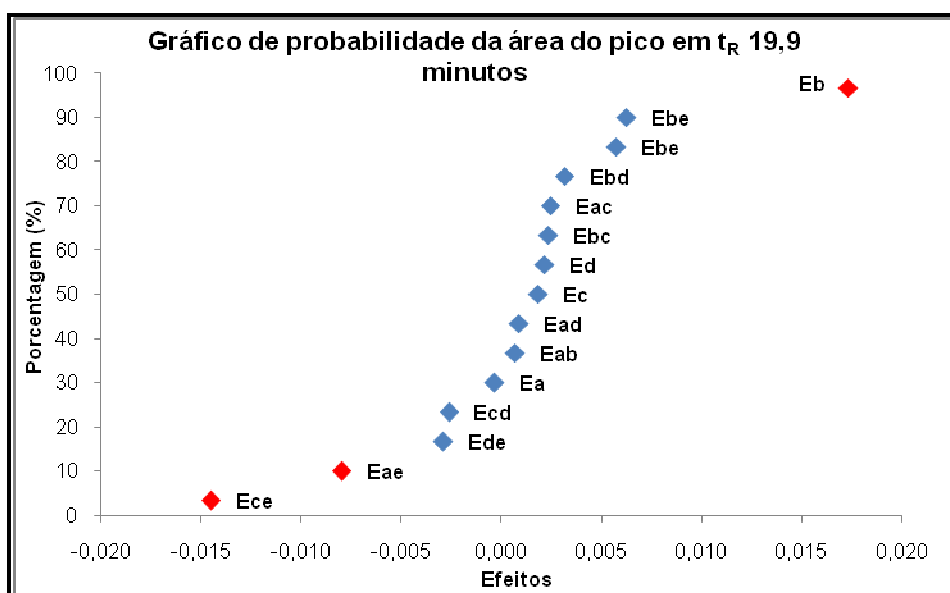


Figura 52 – Gráfico de probabilidade obtido a partir dos efeitos de 1ª e 2ª ordem calculados a partir das áreas do pico da citrinalina A com t_R de 19,9 minutos. Destacados em vermelho estão os efeitos significativos.

Analisando-se o gráfico de probabilidades para o pico em t_R 19,9 minutos (figura 52), pode-se verificar que três efeitos se apresentaram isolados dos demais: **Eb**, efeito da [nutrientes]; **Eae**, efeito da interação da [sais] com a temperatura, e; **Ece**, efeito da interação do tempo com a temperatura. Portanto para o composto que dá origem ao pico com t_R 19,9 minutos, as variáveis [nutrientes], [sais], tempo e temperatura foram significativas para uma maior produção deste composto. Ainda analisando o gráfico da figura 52, pode-se observar que os valores destes efeitos de interação foram bastante baixos, o que significa que houve pouca influência destas variáveis. Pode-se destacar apenas que a variável [nutrientes] resultou em um efeito um pouco maior que os demais. Portanto deve-se utilizar uma composição de meio de cultura com 60% da concentração total de nutrientes para uma maior produção deste composto.

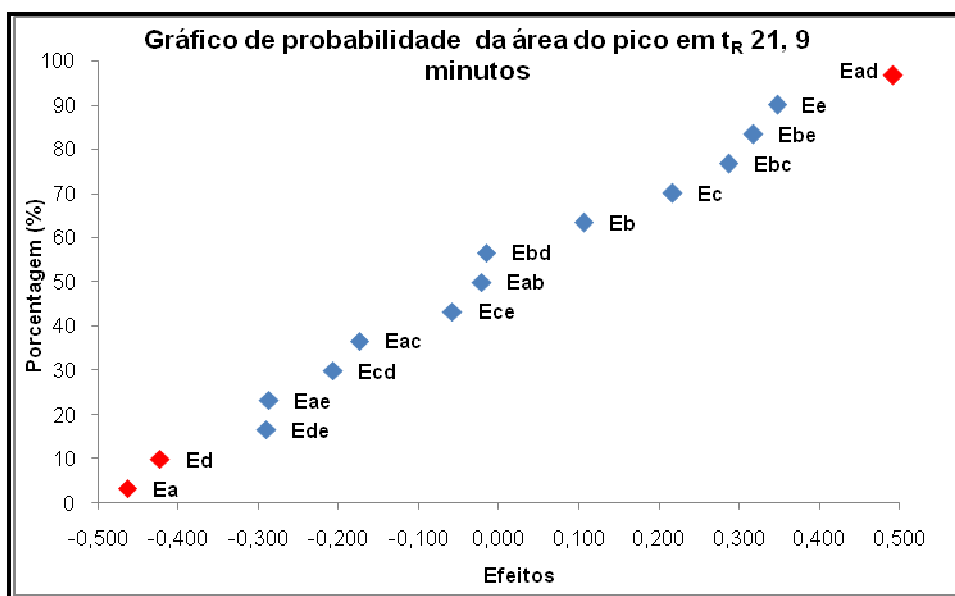


Figura 53 – Gráfico de probabilidade obtido a partir dos efeitos de 1ª e 2ª ordem calculados a partir das áreas do pico da citrinalina A com t_R de 21,9 minutos. Destacados em vermelho estão os efeitos significativos.

Analisando o gráfico de probabilidades para o pico da citrinalina com t_R de 21,9 minutos (figura 53) observa-se que três efeitos se apresentaram isolados dos demais: **Ea**, efeito da [sais]; **Ed**, efeito do pH inicial, e; **Ead**, efeito da interação da [sais] com o pH inicial. Portanto para o composto que dá origem ao pico com t_R 21,9 minutos, as variáveis [sais] e pH inicial foram significativas para uma maior produção deste composto. Ainda analisando-se o gráfico da figura 53, pode-se observar que os valores para Ea e Ed foram negativos e para Ead foi positivo, portanto, ambas as variáveis devem ser utilizadas em seus níveis mais baixos, ou seja, 20% da concentração total de sais e pH inicial 6,0.

Com os resultados obtidos nas análises destes 2 gráficos de probabilidades (figuras 52 e 53), tivemos os seguintes efeitos significativos para a produção destes dois metabólitos:

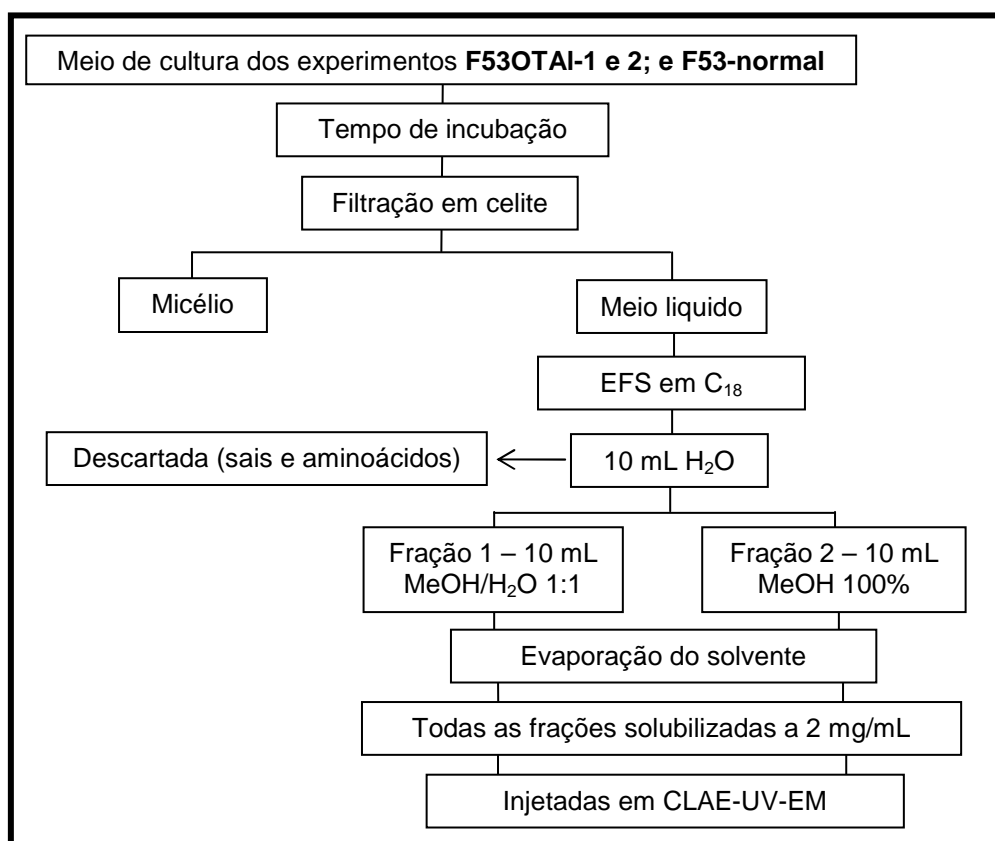
- **Composto com t_R de 19,9 minutos** – apenas uma variável significativa **[nutrientes]** (com 60% da concentração total de nutrientes).
- **Composto com t_R de 21,9 minutos** – duas variáveis significativas **[sais]** (com 20% da concentração total de sais) e **pH inicial** (com pH inicial 6,0).

Portanto, levando-se em conta estes resultados, devemos utilizar duas condições distintas, com a seguinte composição para o meio de cultura para uma maior produção destes metabólitos:

1ª condição – 20% da concentração total de sais, 60% da concentração total de nutrientes, 28 dias de incubação, pH inicial 8 e temperatura de 30°C. Esta condição foi nomeada de **F53OTAI-1**.

2ª condição – 20% da concentração total de sais, 10% da concentração total de nutrientes, 28 dias de incubação, pH inicial 6 e temperatura de 30°C. Esta condição foi nomeada de **F53OTAI-2**.

Estes dois experimentos (1ª condição e 2ª condição) e um experimento com as condições originais (não alteradas) de crescimento, chamado de controle [com as seguintes condições: 100% da concentração de todos os sais; 100% da concentração de todos os nutrientes; 14 dias de incubação; pH inicial 5,8 e temperatura ambiente (condição nomeada **F53-normal**)], foram realizados com a finalidade de verificar e comparar qual o melhor experimento para a produção da citrinalina A. Cada experimento, em triplicata, foi incubado em frascos tipo Schott de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura. Após o período de incubação de cada um dos experimentos, estes foram filtrados em filtro de vidro sinterizado contendo 10 g de celite. O meio de cultura líquido foi então separado do micélio. O meio de cultura líquido foi submetido a uma extração em fase sólida em cartucho C₁₈, contendo 5 g de fase estacionária, com 2 eluentes: **Fração 1** – MeOH/H₂O 1:1 e **Fração 2** – MeOH 100%. Os solventes foram evaporados e cada fração foi pesada, solubilizadas à concentração de 2 mg/mL e injetadas em um equipamento de CLAE-UV-EM, utilizando-se um gradiente de MeOH/MeCN/H₂O (Metanol/acetonitrila/água). O fluxograma a seguir (esquema 4) ilustra todo este processo.



Esquema 4 – Procedimento de filtração e extração dos experimentos F53OTAI-1; F53OTAI-2 e F53-normal.

Após realizar as análises de todas as amostras injetadas em CLAE-UV-EM, obtidas depois de realizados os experimentos de crescimento citados acima, estas geraram cromatogramas que foram monitorados em comprimento de onda de 254 nm. Estes cromatogramas foram analisados monitorando-se a área do pico com espectro no UV semelhante ao encontrado para a citrinalina A. Dois picos foram encontrados, como ilustra a figura 54. As condições cromatográficas, bem como coluna e solvente, destes experimentos são diferentes das utilizadas para o PFF (ver figura 51, página 141).

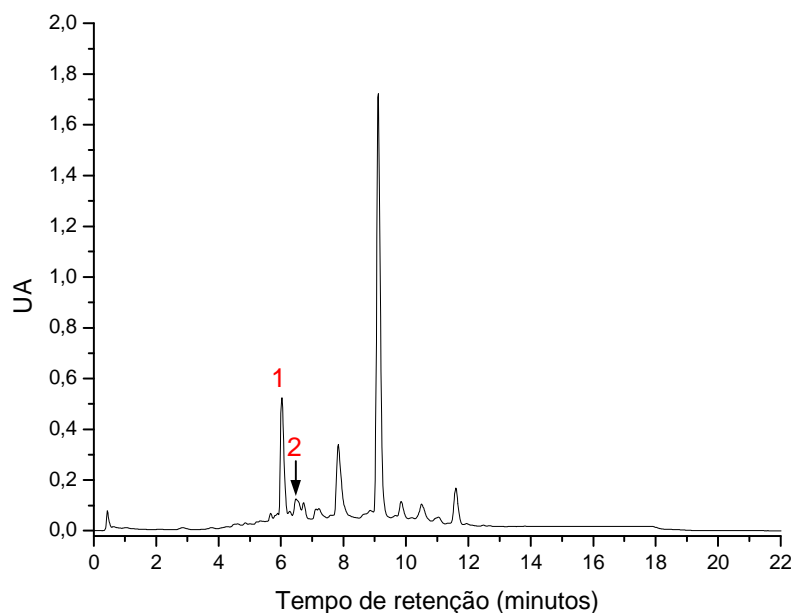


Figura 54 – Picos com perfis químico semelhantes ao da **citralina A**. Este cromatograma é referente a fração 2 (MeOH 100%) obtida da extração em fase sólida do meio de cultura líquido do experimento F53OTAI-1. Condições de análise realizada em coluna C₁₈ X-Terra[®] (dimensões 50 x 2,1 mm; 3,5 µm) eluída com gradiente de MeOH/ACN/H₂O durante 22 minutos com fluxo de 0,5 mL/min. Monitorado em $\lambda = 254$ nm.

As massas obtidas de cada fração da EFS e os resultados obtidos após as análises das áreas dos dois picos detectados nos experimentos realizados em triplicata estão descritos na tabela 34. Estes compostos foram detectados com $t_R = 6,0$ e $t_R = 6,6$ minutos apenas na fração 2 da EFS (MeOH 100%).

Tabela 34 – Massas das frações da EFS e áreas dos picos obtidas após os experimentos de crescimento para uma maior produção da citralina A realizados em triplicata.

Experimento	Massa F1	Massa F2	Área pico com $t_R = 6,0$ min	Área pico com $t_R = 6,6$ min
F53-Normal-1	174,4	4,2	0,0591	0,1456
F53-Normal-2	142	6,9	0,0367	0,0906
F53-Normal-3	142,7	7,3	0,0206	0,0353
F53OTAI-1-1	112,7	2,1	0,4002	0,0279
F53OTAI-1-2	106,9	3,0	0,0915	0,0061
F53OTAI-1-3	118,6	2,0	0,3370	0,0222
F53OTAI-2-1	20,8	0,6	1,5952	0,0395
F53OTAI-2-2	24,5	0,5	1,1218	0,0402
F53OTAI-2-3	25,6	0,3	2,8404	0,1443

Pode-se verificar nos cromatogramas ilustrados na figura 55 a presença dos dois picos com perfis químicos semelhantes ao da citrinalina A e a sua produção nos diferentes experimentos realizados (tabela 34).

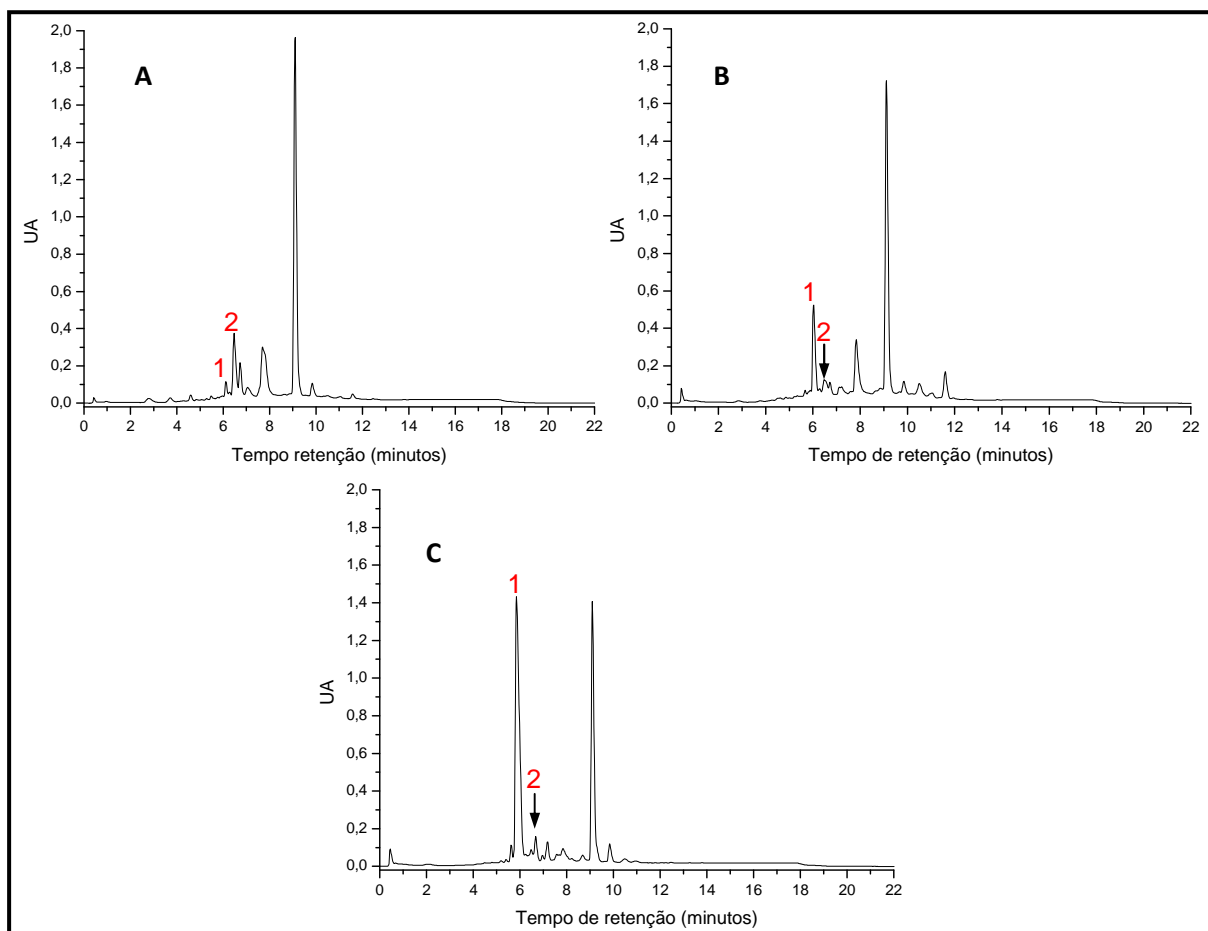


Figura 55 – Áreas dos picos (1 e 2) de dois compostos análogos à citrinalina A. Condições de análise realizada em coluna C₁₈ X-Terra[®] (dimensões 50 x 2,1 mm; 3,5 μm) eluída com gradiente de MeOH/ACN/H₂O por 22 minutos com fluxo de 0,5 mL/min. Monitorado em λ = 254 nm. **A)** Cromatograma da fração 2 (MeOH 100%) obtida da extração em fase sólida do extrato do experimento F53-normal; **B)** Cromatograma da fração 2 (MeOH 100%) obtida da extração em fase sólida do extrato do experimento F53OTAI-1; **C)** Cromatograma da fração 2 (MeOH 100%) obtida da extração em fase sólida do extrato do experimento F53OTAI-2.

Observando os resultados apresentados na tabela 34 e na figura 55, é nítida uma produção mais significativa do alcalóide no pico 1 sob as condições do experimento ótimo **F53OTAI-2** (condição: 20% da concentração de todos os sais; 10% da concentração de todos os nutrientes; 28 dias de incubação; pH inicial 6,0 e

temperatura de 30 °C). Os parâmetros deste experimento foram utilizados para realizarmos um crescimento de *P. citrinum* em 2 litros de meio de cultura (10 frascos Schott de 1000 mL contendo 200 mL de meio de cultura cada), de maneira a isolar-se maiores quantidades deste alcalóide. Após o período de incubação foi realizada uma EFS em cartucho C₁₈ contendo 10 g de fase estacionária, utilizando MeOH e água como solventes, foram obtidas 2 frações: Fração 1 – 50 mL de MeOH/H₂O na proporção 1:1 e Fração 2 – 50 mL de MeOH 100% (este processo de filtração e extração em fase sólida foi apresentado no fluxograma do esquema 4). O alcalóide detectado foi identificado apenas na fração 2 da EFS.

Após realizar o processo de filtração dos 2 litros de meio de cultura, EFS e evaporação do solvente das frações foram obtidas as seguintes massas:

Fração 1 MeOH/H₂O 1:1 – 752,0 mg

Fração 2 MeOH 100% – 36,3 mg

Apenas a fração 2 foi submetida ao processo de purificação por CLAE, pois o alcalóide foi observado apenas nesta fração.

Após o processo de purificação foram obtidos 3,8 mg do alcalóide puro cujo código é **F53OTAI-2-P1**. Este foi analisado por CLAE-UV-EM e os espectros de absorção na região do UV e de massas são apresentados na figura 56.

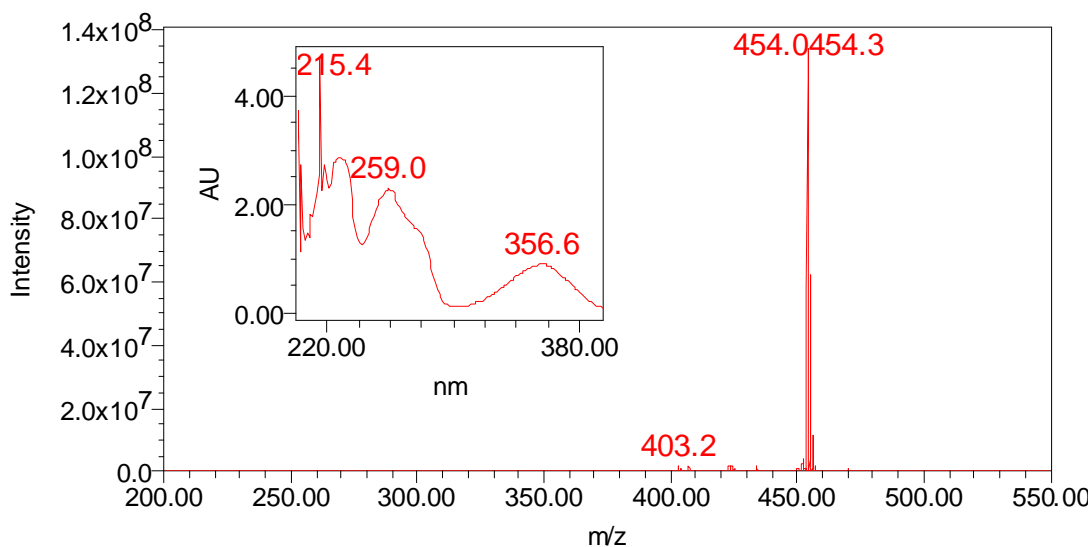


Figura 56 – Espectros de absorção na região do UV e de massas obtidos para a amostra **F53OTAI-2-P1**. Condições de ionização: modo de ionização por SE^+ e cone com voltagem de 25 V.

A análise do espectro de absorção na região do UV, indicou a presença de 4 bandas de absorção: em 215, 225, 259 e 356 nm. A análise do espectro de massas apresentou apenas um íon em m/z 454, que foi atribuído ao pico do íon quasi-molecular $[M + H]^+$. Estes espectros são idênticos dos observados para a citrinalina A **60** (isolada da amostra F53-F4-P7 na página 130 figura 49).

Esta amostra foi enviada para o Canadá para posteriores análises de RMN. Foi observado que esta amostra se trata de um isômero da citrinalina A (**60**) isolada inicialmente, e foi nomeado de citrinalina B (**62**).

A análise por espectrometria de massas de alta resolução indicou um íon quasi-molecular em m/z 454,2342, correspondente à mesma fórmula molecular da citrinalina A ($C_{25}H_{31}N_3O_5$). As análises espectroscópicas de RMN- 1H e ^{13}C indicaram claramente que este composto é um estereoisômero de (**60**). As atribuições de RMN para a citrinalina B (**62**) estão apresentados na tabela 35 e foram estabelecidas após a análise dos seus espectros de RMN- 1H , RMN- ^{13}C , HSQC, N1HSHC, COSY e

HMBC (respectivamente, figuras **v2-29 a-f**, **v2-30 a-c**, **v2-31 a-c**, **v2-31 d**, **v2-32 a-b** e **v2-33 a-e**, volume 2).

Tabela 35 – Dados dos deslocamentos químicos obtidos para a citrinalina B (**62**) comparados com os dados obtidos para a citrinalina A (**60**). Espectros de RMN-¹H (600 MHz) e de RMN-¹³C (150 MHz) realizados em DMSO-*d*₆.

Posição	Citrinalina A (59)		Citrinalina B (61)	
	δ_C , mult. (δ_N)	δ_H (J in Hz)	δ_C , mult. (δ_N) ^a	δ_H (J in Hz)
1	57.5, C		58.3, C	
2	182.9, C		182.4, C	
3	(- 242.1), NH	10.35, s	(- 241.1), NH	10.10, s
4	79.3, C		79.2, C	
5	48.0, CH ₂	2.84, d (16.6) 2.75, d (16.6)	48.0, CH ₂	2.80, d (16.6) 2.74, d (16.6)
6	192.6, C		192.6, C	
7	105.2, C		104.9, C	
8	158.8, C		158.7, C	
9	109.6, CH	6.61, d (8.3)	108.8, CH	6.53, d (8.3)
10	132.4, CH	7.34, d (8.3)	132.7, CH	7.51, d (8.3)
11	120.9, C		119.5, C	
12	142.6, C		142.8, C	
13	46.1, C		48.7, C	
14	45.8, CH	2.89, dd (14.0, 3.5)	43.9, CH	3.63, d (9.8)
15	19.8, CH ₂	2.39, ddd (14.0, 14.0, 6.1) 1.88, dd (14.0, 3.5)	26.8, CH ₂	1.83, dd (13.5, 3.2) 1.71, m
16	61.1, CH	4.19 nd	61.3, CH	1.92, nd
17	26.1, CH ₂	2.24, m 1.93, m	30.9, CH ₂	1.90, nd 1.22, nd
18	20.0, CH ₂	2.19, m 2.05, m	20.8, CH ₂	1.63, m
19	55.5, CH ₂	3.50 nd 3.24, m	52.9, CH ₂	2.87, m 1.96, ddd (8.9, 8.9, 8.9)
20	(-316.7), NH	9.41, bs	(n.o.), NH	
21	55.4, CH ₂	4.19 nd 3.53, dd (14.0, 10.9)	64.1, CH ₂	3.61, d (12.9) 2.68, d (12.9)
22	92.4, C		94.6, C	
23	41.0, CH ₂	3.19, d (16.3) 2.43, d (16.3)	41.3, CH ₂	2.65, d (15.7) 2.61, d (15.7)
24	25.8, CH ₃	1.38, s	26.0, CH ₃	1.37, s
25	26.5, CH ₃	1.41, s	26.3, CH ₃	1.39, s
26	20.3, CH ₃	0.62, s	22.7, CH ₃	0.69, s
27	23.4, CH ₃	0.83, s	22.9, CH ₃	0.97, s

A estereoquímica relativa da citrinalina B, também foi determinada pela análise do seu espectro tROESY (figura **v2-35 a-b**, volume 2). Acoplamentos

dipolares observados entre H-10 (δ 7,51) e H23a (δ 2,65) e Me-27 (δ 0,97); muito fraco entre Me-27 e H-15a (δ 1,83); entre H23a e H-21b (δ 3,61); bem como entre H-19b (δ 1,96) e H-21b e H-17a (δ 1,90) possibilitaram o posicionamento desses hidrogênios na mesma face da citrinalina B. Por outro lado, efeitos NOEs observados entre Me-26 (δ 0,69) e H-14 (δ 3,63); entre H-14 e H-15b (δ 1,71), H-16 (δ 1,92), H-21a (δ 3,61) e H-23b (δ 2,61); bem como entre H-16 e H-21a, possibilitou posicionar estes prótons na face oposta da citrinalina B.

Alterações significativas de deslocamento químico observadas para CH₂-15, CH₂-17 e CH₂-21 levaram-nos a propor uma conformação cadeira para o anel central de seis membros com uma relação cis entre H-14 e H-16, em que o grupo nitro deve ter uma orientação axial.

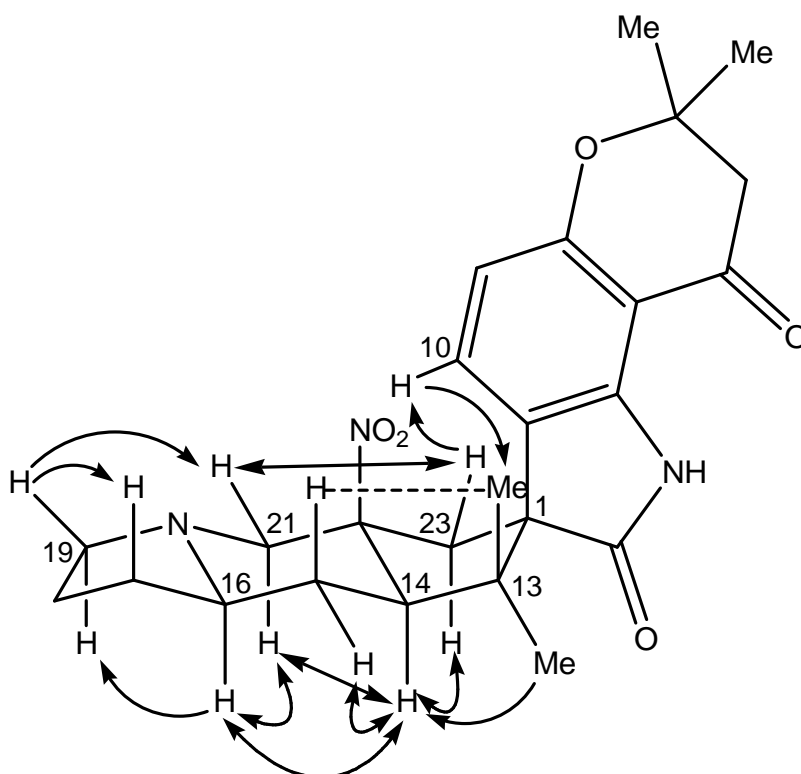
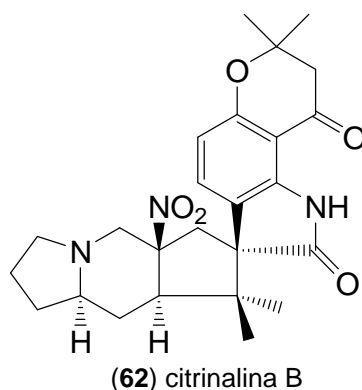


Figura 57 – Efeitos NOE observados para a citrinalina B.

Os dados de NOE permitiu-nos propor a estereoquímica relativa para a citrinalina B com sendo 1S *, 14R *, 16R *, 22S *.



Portanto o composto com m/z 454 e $t_R = 6,0$ minutos é a **citrinalina B (62)** e o composto com m/z 454 e $t_R = 6,6$ minutos é a **citrinalina A (60)**.

A análise dos resultados obtidos na otimização para a produção da citrinalina A (tabela 34 e figura 55) possibilitou observar que houve incremento na produção de um isômero, a citrinalina B (62). Para a citrinalina A não houve nenhum aumento em sua produção. No entanto, para a citrinalina B houve um incremento na área do pico da fração 2 da EFS de mais de 4500% se comparado com as áreas do pico da fração 2 da EFS obtido para o experimento sem alterações (F53-Normal). Levando em conta que a massa total obtida para a fração 2 da EFS foi de 36,3 mg, e que foram isolados 3,8 mg da citrinalina B, tem-se uma proporção de 10% de composto puro para a massa total de extrato, considerando-se as perdas que ocorreram em todas as purificações citadas anteriormente. No processo de isolamento da citrinalina B provavelmente essa perda também ocorreu. Pode-se concluir, então, que foi alta a proporção de isolamento do composto puro em relação a massa total de extrato obtido.

Todavia, apenas 3,8 mg de citrinalina B pura foi obtida a partir de 2 L de meio de cultura. Uma das razões de ter sido isolada pouca quantidade do composto. pode

ser pelo fato deste possuir um coeficiente de absorção molar alto. Com isso, o incremento na área do pico seria alto e, necessariamente, não se observaria um aumento na mesma proporção para a massa do composto. Outra razão pelo fato de obter-se pouca massa seria pelo fato deste composto ser produzido pela linhagem de *P. citrinum* em condições totalmente adversas ao seu crescimento, tal como pouca disponibilidade de nutrientes. Mas os resultados obtidos nas análises multivariadas indicaram que este composto só é produzido em maior quantidade nessa condição experimental. Levando-se em conta tais possibilidades, e dados da literatura, pode-se concluir que algumas substâncias são produzidas em muito pouca quantidade mesmo que em condições totalmente favoráveis para a sua produção mas não para o crescimento do fungo. Em muitos casos, para se obter maiores quantidades de determinados compostos além de se realizar uma otimização, deve-se realizar uma produção em larga escala, como crescimento em 50 Litros de meio de cultura, por exemplo (ARSLANIAN, et al., 2002).

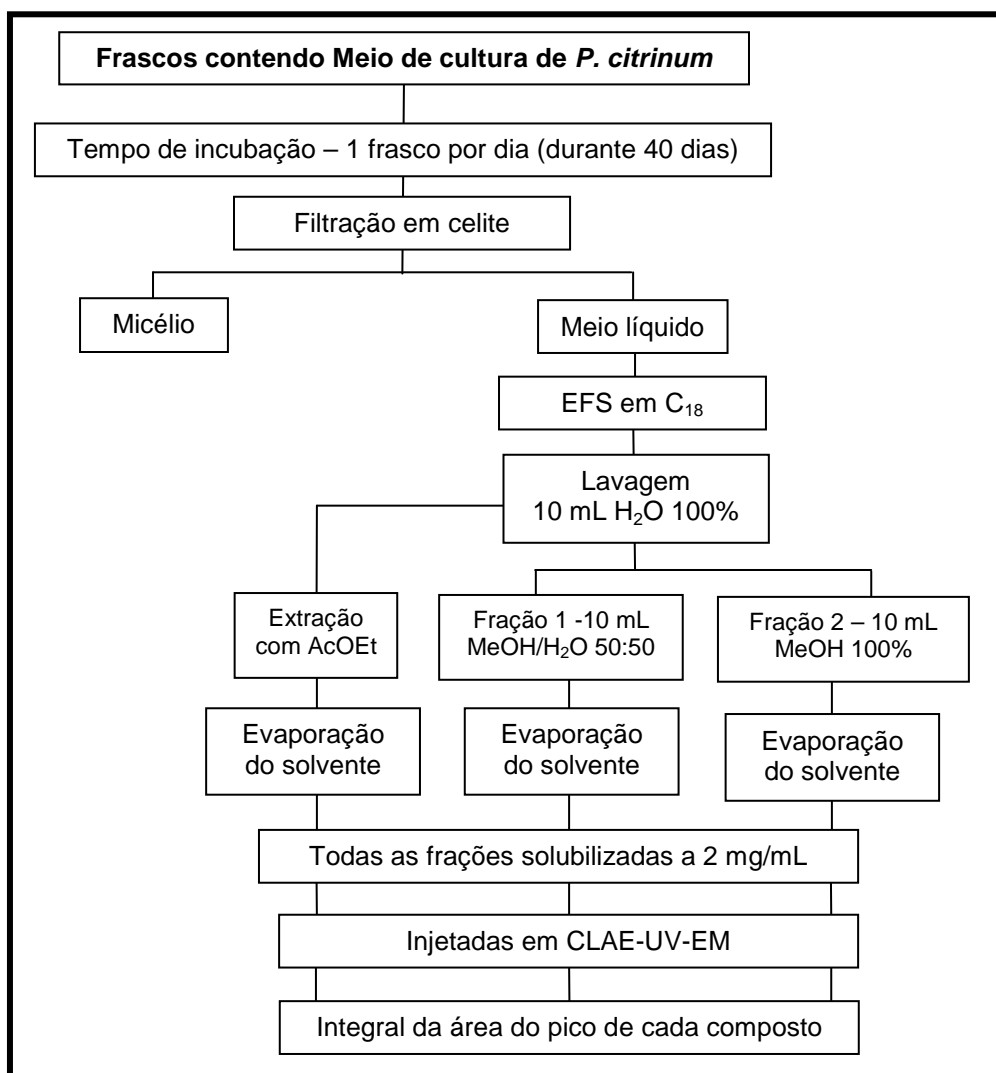
4.3 Curva da produção de metabólitos secundários por *P. citrinum*

P. citrinum é uma das espécies mais estudadas dentro do gênero *Penicillium*, por possuir um metabolismo secundário extremamente diversificado. As classes de metabólitos secundários isolados deste gênero diferem bastante, mas para as diferentes linhagens de *P. citrinum* esta variação de classes de metabólitos é ainda maior. Algumas linhagens de *P. citrinum* são capazes de produzir diferentes classes de metabólitos apenas alterando-se o tempo de incubação. A espécie de *P. citrinum* estudada é uma destas linhagens, rica em metabólitos secundários. Portanto, o experimento descrito a seguir teve como finalidade observar o comportamento

metabólico da linhagem de *P. citrinum* isolada por Aline M. de Vita-Marques em 2003.

As condições experimentais utilizadas para este experimento foram as mesmas utilizadas para uma maior produção de metabólitos secundários por *P. citrinum*: 20% da concentração de todos os sais; 60% da concentração de todos os nutrientes; pH inicial 8,0 e temperatura de 30 °C.

O fungo foi inoculado em 90 frascos de 250 mL de capacidade contendo 50 mL de meio de cultura. Durante um período de 40 dias, a cada dia dois frascos (duplicata) contendo 50 mL de meio de cultura foram processados da seguinte maneira: filtração em filtro de vidro sinterizado contendo 5 g de celite; realização de uma extração em fase sólida (EFS) e uma partição com AcOEt (acetato de etila) da fase aquosa obtida a partir da lavagem da coluna na EFS com H₂O; evaporação do solvente de cada fração de EFS e do extrato de AcOEt. Após o período de 40 dias, cada fração da EFS e extrato de AcOEt obtidos a cada dia foram injetados em CLAE-UV-EM a uma concentração padrão de 2 mg/mL cada. Cada fração e extrato geraram um cromatograma monitorado no UV (254 nm). Para cada cromatograma foi realizada a integral da área de cada pico encontrado. O fluxograma apresentado, no esquema 5, a seguir ilustra todo este processo.



Esquema 5 – procedimento de filtração e extração dos experimentos realizados para obter a curva de crescimento dos metabólitos secundários produzidos por *P. citrinum*.

Foram encontrados, e tiveram sua produção monitorada, 8 diferentes metabólitos secundários (como ilustra a figura 58).

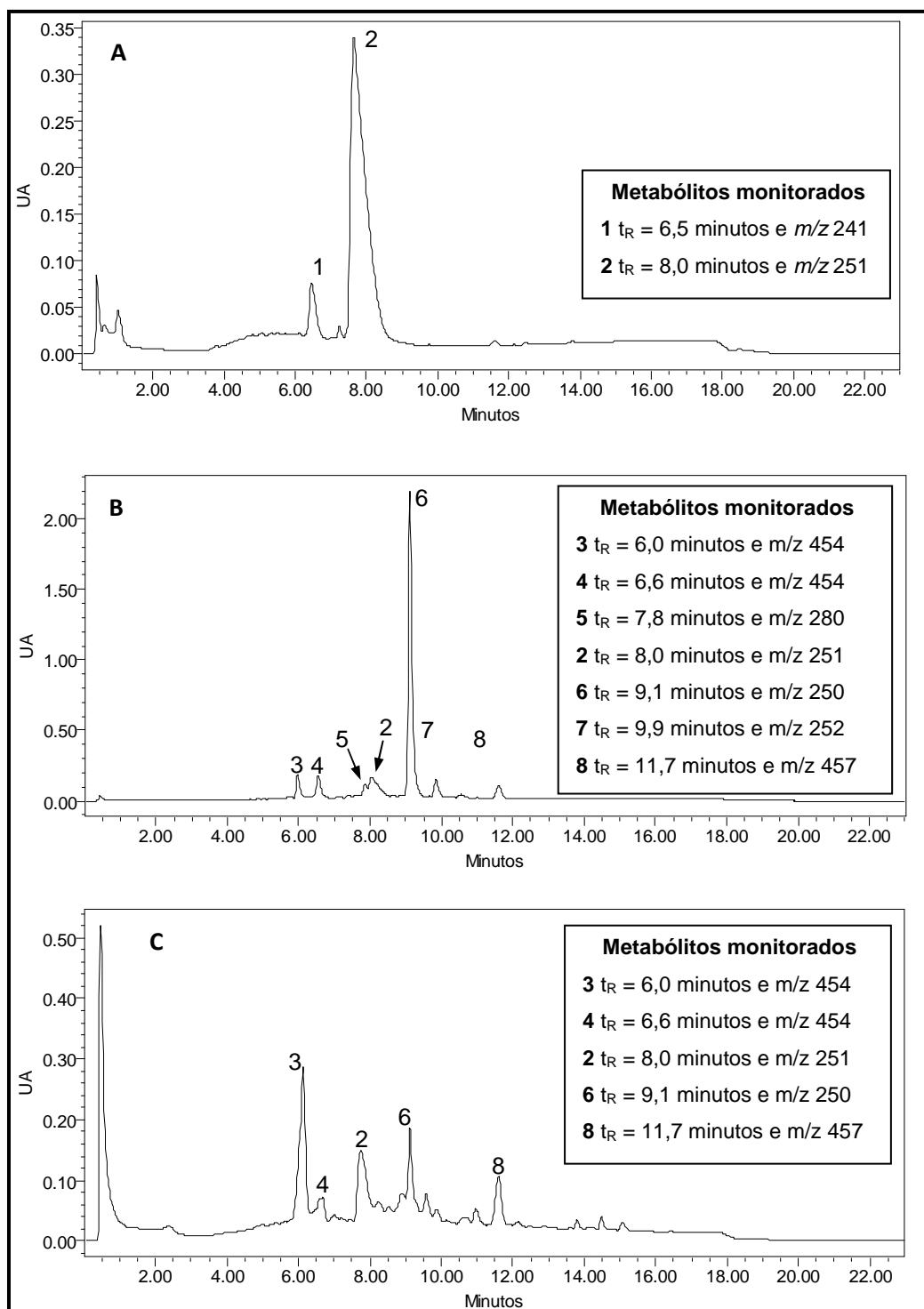


Figura 58 – Cromatogramas contendo os picos dos metabólitos secundários produzidos pela linhagem de *P. citrinum*. Condições de análise realizada em coluna C_{18} X-Terra® (dimensões 50 x 2,1 mm; 3,5 μ m) eluída com gradiente de MeOH/MeCN/H₂O por 22 minutos com fluxo de 0,5 mL/min. Monitorado em $\lambda = 254$ nm. **A)** Cromatograma da fração 1 (MeOH/H₂O 1:1) obtida da EFS do experimento de 14 dias; **B)** Cromatograma da fração 2 (MeOH 100%) obtida da EFS do experimento de 14 dias; **C)** Cromatograma do extrato de AcOEt obtido a partir da extração da fase aquosa do meio de cultura filtrado do experimento de 14 dias.

Observando-se as duas frações obtidas da EFS e o extrato de AcOEt (na figura 58 acima) verificou-se que um mesmo composto com ***m/z* 251** (pico 2, $t_R = 8,0$ minutos) foi observado nas 2 frações da EFS e no extrato de AcOEt. Também verificamos que outros 4 compostos estiveram presentes na fração 2 da EFS e no extrato de AcOEt: ***m/z* 454** (pico 3, $t_R = 6,0$ minutos); ***m/z* 454** (pico 4, $t_R = 6,6$ minutos); ***m/z* 250** (pico 6) e ***m/z* 457** (pico 8). As áreas destes metabólitos que estiveram presentes em mais de uma fração da EFS foram somadas. Deste modo, foram obtidas áreas totais proporcionais à quantidade total de cada composto produzido pela espécie de *P. citrinum*. Após a análise de cada dia, foi possível estabelecer uma curva de produção para cada metabólito secundário produzido por *P. citrinum*.

Neste experimento de 40 dias de crescimento foi verificada a produção de 8 diferentes metabólitos. Destes, 5 compostos já haviam sido anteriormente isolados e identificados (por comparação pela injeção dos padrões):

- O composto com $t_R = 6,0$ minutos e *m/z* 454 é a citrinalina B (**62**).
- O composto com $t_R = 6,6$ minutos e *m/z* 454 é a citrinalina A (**60**).
- O composto com $t_R = 8,0$ minutos e *m/z* 251 provavelmente é a citrinina (**31**).
- O composto com $t_R = 9,1$ minutos e *m/z* 250 é o (8*E*)-1-(2,3-diidropirrol-1-il)-2-metildec-8-eno-1,3-diona (**56**).
- O composto com $t_R = 9,9$ minutos e *m/z* 252 é o 1-(2,3-diidropirrol-1-il)-2-metildecano-1,3-diona (**58**).

Os compostos produzidos por *P. citrinum*, e observados neste experimento, que não foram tiveram a estrutura elucidada foram:

- O composto com $t_R = 6,5$ minutos e m/z 241 (espectros de UV e de massas apresentados na figura 59).
- O composto com $t_R = 7,8$ minutos e m/z 280 (espectros de UV e de massas na figura 60).
- O composto com $t_R = 11,7$ minutos e m/z 457 (espectros de UV e de massas na figura 61).

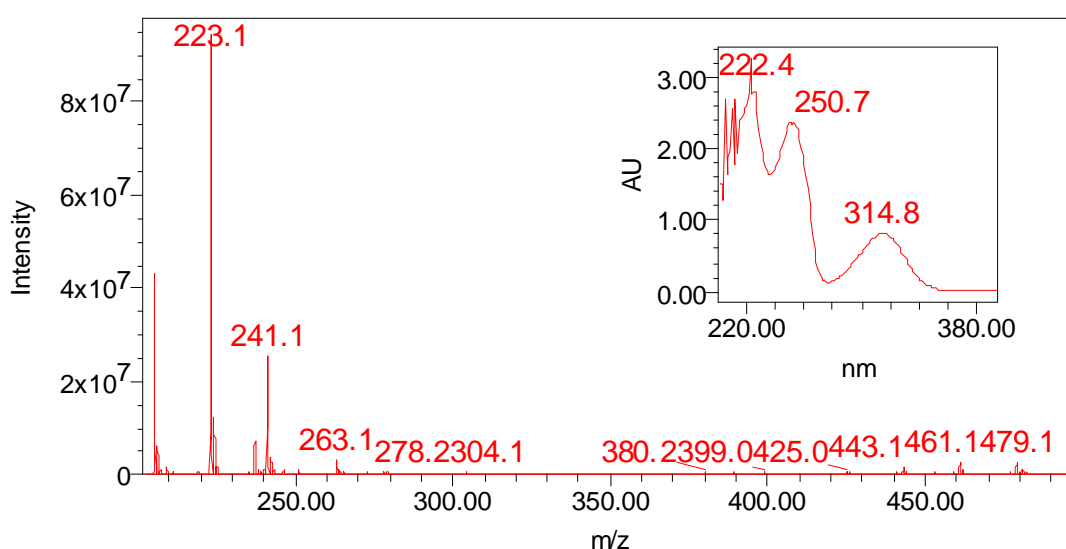


Figura 59 – Espectros de absorção na região do UV e de massas e de UV obtidos para o composto com $t_R = 6,5$ minutos. Condições de ionização: modo de ionização por SE^+ e cone com voltagem de 25 V.

Observa-se que o composto com pico em $t_R = 6,5$ minutos dos cromatogramas da figura 59 apresenta íon quasi-molecular em m/z 241, que pode corresponder a $[M + H]^+$. O íon em m/z 263 pode ser a molécula cationizada com átomo de sódio, $[M + Na]^+$. O seu espectro no UV apresentou bandas de absorção em 3 diferentes comprimentos de onda: 222, 250 e 315 nm. Comparando estes resultados com os espectros de UV e massas da fração F53OT-3-P1-4 com m/z 251 (figura 24, página 103), pode-se observar uma diferença de apenas 10 unidades de massa. A amostra F53OT-3-P1-4 apresentou em seu espectro no UV os

comprimentos de onda: 213, 251 e 317 nm. Estes compostos devem ser estruturalmente relacionados. Uma purificação por CLAE foi realizada para proporcionar o isolamento deste composto com íon em m/z 241. Foram obtidos 3,4 mg do composto puro e este foi enviado para a UFSCar para serem realizadas análises espectroscópicas. Os resultados de RMN de ^1H e ^{13}C estão sendo analisados e futuramente a estrutura do composto será determinada.

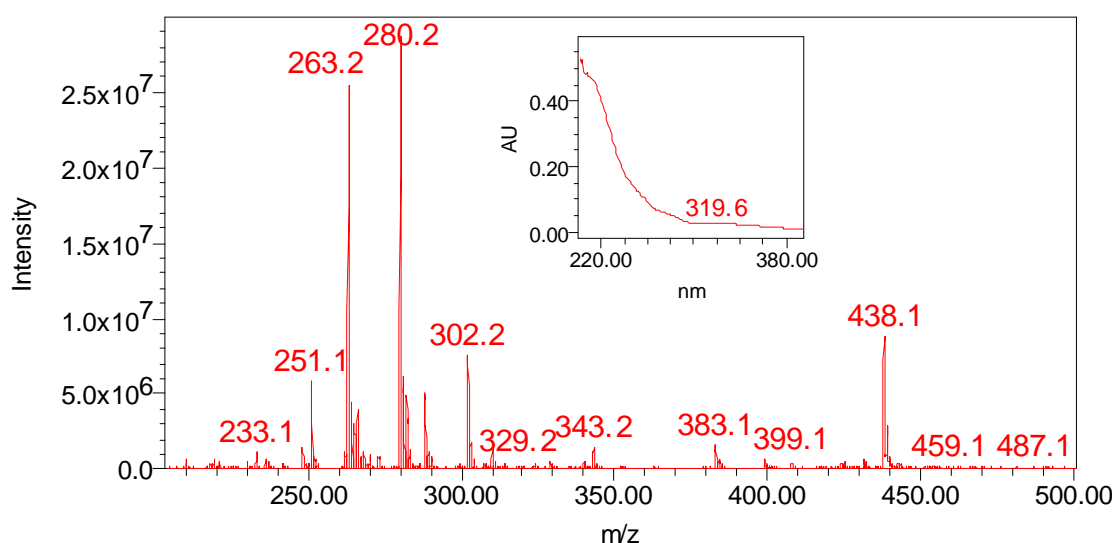


Figura 60 – Espectros de absorção na região do UV e de massas e de UV obtidos para o composto com $t_R = 7,8$ minutos. Condições de ionização: modo de ionização por SE^+ e cone com voltagem de 25 V.

No caso do composto com $t_R = 7,8$ minutos (figura 60), observou-se que este apresentou íon quasi-molecular em m/z 280, que deve corresponder a $[\text{M} + \text{H}]^+$, e íon em m/z 302 que deve corresponder a molécula cationizada com átomo de sódio, $[\text{M} + \text{Na}]^+$. O seu espectro no UV apresenta apenas uma absorção em 213 nm aproximadamente. Este composto pode ser algum análogo das scalusamidas (**46** ou **47**). Infelizmente este composto foi obtido em pouca quantidade, e, portanto, não foi possível purificá-lo para elucidar a sua estrutura.

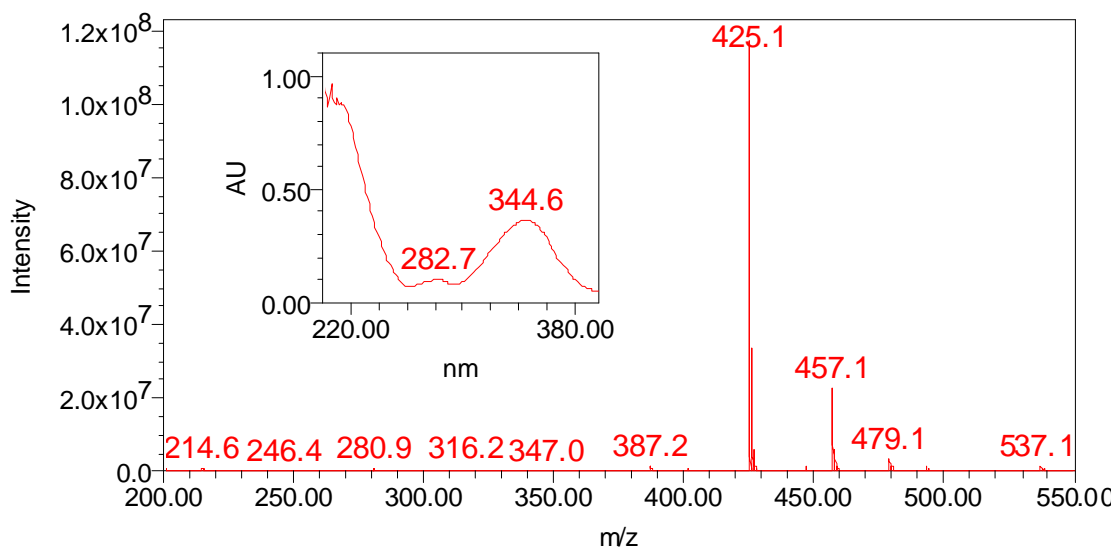


Figura 61 – Espectros de absorção na região do UV e de massas e de UV obtidos para o composto com $t_R = 11,7$ minutos. Condições de ionização: modo de ionização por SE^+ e cone com voltagem de 25 V.

O composto com $t_R = 11,7$ minutos (figura 61) apresentou em seu espectro de massas um íon quasi-molecular m/z 457, provavelmente $[M + H]^+$. Também pode-se observar que houve pouca fragmentação da molécula no modo IES⁺ (ionização por spray de elétrons com carga positiva). O espectro de absorção na região do UV apresentou duas bandas de absorção, em 213 e 344 nm, e uma banda de absorção pouco intensa em 282 nm. Foi realizada uma vasta busca na literatura e nenhum composto com características químicas semelhantes foi encontrado. Este composto também foi obtido em pouca quantidade, impossibilitando sua purificação para a realização de análises espectroscópicas.

Os resultados obtidos para estabelecer uma curva de produção para cada um dos 8 metabólitos secundários (ver figura 58, página 158), estão representados na figura 62.

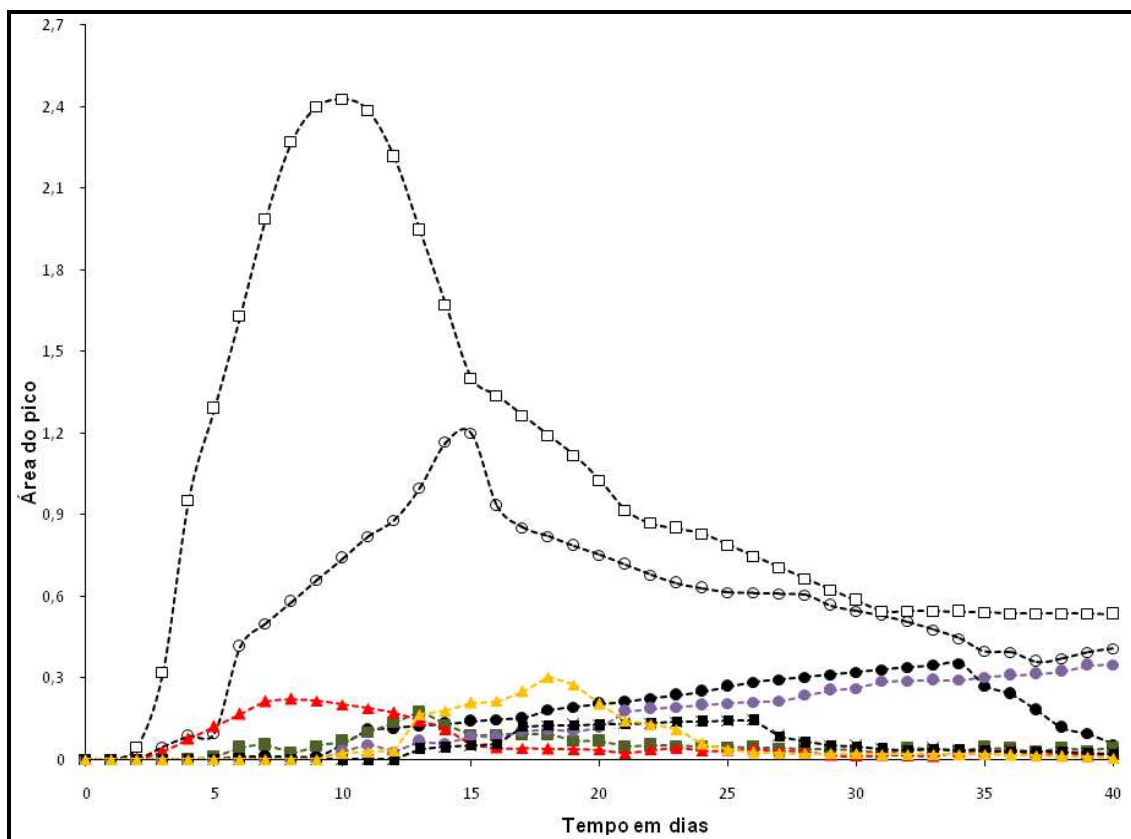


Figura 62 – Curva de produção dos metabólitos secundários obtidos a partir da linhagem de *P. citrinum* estudada. Curvas: ● citrinalina B (**62**); ■ citrinalina A (**60**); ○ citrinina (**31**); □ $(8E)$ -1-(2,3-diidropirrol-1-il)-2-metildec-8-eno-1,3-diona (**56**); ▲ 1-(2,3-diidropirrol-1-il)-2-metildecano-1,3-diona (**58**); ▲ Composto não identificado (m/z 457); ● Composto não identificado (m/z 241); ■ Composto não identificado (m/z 280).

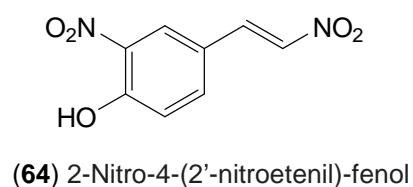
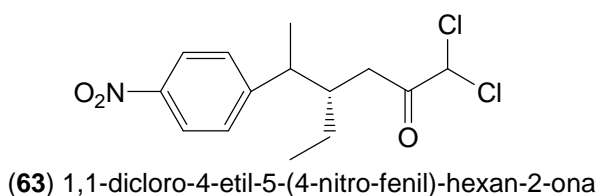
Observou-se que a citrinalina A, a provável citrinina, o composto $(8E)$ -1-(2,3-diidropirrol-1-il)-2-metildec-8-eno-1,3-diona (**56**) e o composto 1-(2,3-diidropirrol-1-il)-2-metildecano-1,3-diona (**58**) têm produção máxima entre 10 a 14 dias de incubação. Já a citrinalina B têm produção iniciada em 10 dias e continua até 35 dias aproximadamente. O composto desconhecido com m/z 457 tem produção iniciada em 12 dias continuando até 25 dias aproximadamente. O composto desconhecido com m/z 241 tem produção iniciada em aproximadamente 10 dias e é produzido de maneira linear até o período monitorado de 40 dias, e provavelmente continua sendo produzido após este período. O composto desconhecido com m/z 280 tem produção iniciada após 10 dias e é produzido até 30 dias aproximadamente.

Estes resultados indicam que o fungo *P. citrinum* produz diferentes compostos ao longo de seu período de crescimento. Provavelmente esta linhagem usa alguns desses metabólitos secundários para suprir a falta de algum nutriente, ou para inibir a produção de toxinas (tal como citrinina) nocivas para seu crescimento. Pode-se observar (figura 69) que após 15 dias, aproximadamente, outros compostos começam a ser produzidos em maior quantidade e outros parecem cessar a produção. Muitos microrganismos são capazes de produzir novos compostos quando induzidos pela falta de nutrientes ou pela presença de compostos nocivos ao seu crescimento (CHRISTIAN, et al., 2005).

Os resultados obtidos neste trabalho, indicam que a linhagem de *P. citrinum* estudada possui um metabolismo extremamente diversificado, pois verifica-se a presença de no mínimo 8 diferentes metabólitos secundários produzidos por esta espécie. Os compostos **56** e **58** haviam sido isolados pela primeira vez de uma linhagem de *P. brevicompactum*, é o primeiro relato de que tais compostos tenham sido obtidos de uma espécie de *P. citrinum*. A citrinina e um isômero também foram isolados, e no mínimo outros 3 compostos, também foram identificados no extrato produzido pela linhagem, mas estes foram produzidos em pouca quantidade e não foi possível elucidar suas estruturas.

O estudo realizado proporcionou, ainda, o isolamento de dois compostos inéditos, alcalóides indólicos contendo um grupo nitro, nomeados de citrinalinas A e B. Compostos naturais contendo grupos nitro são extremamente raros, e costumam ser biologicamente ativos. Dentre os fármacos que possuem um grupo nitro podemos citar o antimicrobiano cloranfenicol isolado por EHRLICH et al. em 1947 de uma espécie de actinomiceto; a ranitidina descoberta por BRADSHAW et al. em 1979 que é utilizada no tratamento de úlcera, e a nimesulida desenvolvida por

SWINGLE et al. em 1984 que possui efeito antiinflamatório. Atualmente outros compostos nitrados tem sido isolados de fontes naturais, dentre os quais pode-se citar: o 1,1-dicloro-4-etil-5-(4-nitro-fenil)-hexan-2-ona (**63**) isolado da actinobactéria marinha *Niocardia* sp. ALAA 2000 (EL-GENDY; HAWAS; JASPARS; 2008), que possui atividade antimicrobiana, e o 2-nitro-4-(2'-nitroetenil)-fenol (**64**) isolado da bactéria marinha *Salegentibacter* sp. T436 (AL-ZEREINI, et al., 2007) que possui atividade citotóxica e antimicrobiana.



Com os resultados obtidos para a linhagem de *P. citrinum* é possível indicar que esta linhagem estava de fato associada à alga *Caulerpa* sp., pois apresentou metabólitos secundários distintos daqueles isolados de representantes terrestres, o que evidencia o potencial metabólico de microrganismos obtidos a partir do ambiente marinho na busca por novos compostos.

Quanto aos resultados obtidos na otimização, pode-se afirmar que a metodologia utilizada é extremamente útil para explorar o comportamento metabólico de fungos com a finalidade de se obter maiores quantidades e diversidade de metabólitos secundários.

O processo de otimização das condições de crescimento e produção de metabólitos secundários pelas linhagens fúngicas estudadas, foi trabalhoso ao se analisar os resultados para obter-se uma condição ótima de crescimento. Mas, o uso do PFF como método de análise, com certeza é menos complexo que outros métodos multivariados utilizados para se obter melhores rendimentos experimentais.

Capítulo 5

Conclusões

Capítulo 5 – Conclusões

Nos últimos anos o uso de análise multivariada vem sendo empregada por muitos pesquisadores na busca por uma maior produção para apenas um metabólito secundário de interesse. Em nosso trabalho foi observado que este tipo de análise pode ser utilizado com o intuito de favorecer a produção da maior diversidade de metabólitos, e não somente para um composto. Verificou-se nos resultados que uma maior quantidade e diversidade de compostos foi obtida para as duas linhagens em estudo. O planejamento fatorial fracionário com ponto central foi escolhido como método de análise multivariada, pelo fato das análises destes serem de menor complexidade que outros tipos de análises estatísticas.

A escolha em realizar EFS como método de extração também foi excelente, pois além de ser uma técnica de fácil aplicação, esta também se mostrou eficiente na extração de metabólitos secundários do meio de cultura. Além disso, uma modificação no procedimento experimental poderia ser feita, de modo a se obter duas frações da EFS: MeOH/H₂O 1:1 e outra com MeOH 100%, ao invés de 4 frações como foi realizado, pois foi verificado que frações com maior quantidade de água possuíam muitos componentes do meio de cultura.

A abordagem utilizada na escolha dos parâmetros a serem utilizados na análise multivariada foi adequada para o projeto. Mas, analisando atentamente os resultados obtidos verificou-se que o metabolismo dos fungos em estudo varia modificando-se apenas três parâmetros: concentrações de nutrientes e sais, e o tempo de incubação (pH inicial e temperatura não foram tão importantes). Portanto, poderíamos incluir outros parâmetros para, talvez, promover outras alterações no metabolismo fúngico. Tais como diferentes meios de cultura e quantidade inicial de esporos.

A metodologia utilizada no estudo visando uma maior produção de metabólitos secundários por *P. oxalicum* e *P. citrinum* foi importante e mostrou ser válida na busca por novos compostos naturais. Portanto, o estudo realizado foi de grande importância para o desenvolvimento da pesquisa visando a produção e isolamento de produtos naturais oriundos de microrganismos.

Capítulo 6

Referências bibliográficas

Capítulo 6 – Referências bibliográficas

ALEXOPOULOS C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory micology**. New York: John Wiley, 1996. 869 p.

AL-ZEREINI, W.; SCHUHMANN, I.; LAATSCH, H.; HELMKE, E.; ANKE, H. New aromatic nitro compounds from *Salegentibacter* sp. T436, an arctic sea ice bacterium: taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 60, p. 301–308, 2007.

ARSLANIAN, R. L.; TANG, L.; BLOUGH, S.; MA, W.; QIU, R.; KATS, L.; CARNEY, J. R. A new cytotoxic epothilone from modified polyketide synthases heterologously expressed in *Myxococcus xanthus*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 65, p. 1061-1064, 2002.

BLUNT, J. B., COPP, B.; HU, W.; MUNRO, P. T.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural Products Reports**, Cambridge, v. 26, p. 170-244, 2009.

BLUNT, J. B., COPP, B.; MUNRO, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural Products Reports**, Cambridge, v. 27, p. 165-237, 2010.

BOND, R. F.; BOEYENS, J. C. A.; HOLZAPFEL, C. W.; STEYN, P. S. Cyclopiamines A and B, novel oxindole metabolites of *Penicillium cyclopium* Westling. **Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 1**, London, p. 1751 – 1761, 1979.

BRADSHAW, J.; BRITTAIN, R. T.; CLITHEROW, J. W. Ranitidine (AH 19065) – new potent, selective histamine H₂-receptor antagonist. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 66, p. 464-464, 1979.

BROWN, A. G.; SMALE, T. C.; KING, T. J.; HASENKAMP, R.; THOMPSON, H. Cristal and molecular structure of compactin, a new antifungal metabolite from *Penicillium brevicompactum*. **Journal Chemical Society Perkin**, Cambridge, v. 11, p. 1165-1170, 1976.

BUGNI, T. S.; IRELAND, C. M. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 21, p. 143-163, 2004.

BULL, A. T.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 64, p. 573-606, 2000.

CANTÍN, A.; MOYA, P.; CASTILLO, M. A.; PRIMO, J.; MIRANDA, M. A.; PRIMO-YÚFERA, E. Isolation and synthesis of *N*-(2-methyl-3-oxodec-8-enoyl)-2-pyrroline and 2-(hept-5-enyl)-3-methyl-4-oxo-6,7,8,8a-tetrahydro-4*H*-pyrrolo[2,1-*b*]-1,3-oxazine. Two new fungal metabolites with *in vivo* anti-juvenile-hormone and insecticidal activity. **European Journal of Organic Chemistry**, Weinheim, v. 1999, p. 221-226, 1999.

CAPON, R. J.; STEWART, M.; RATNAYAKE, R.; LACEY, E; GILL, J. H. Citromycetins and bilains A–C: new aromatic polyketides and diketopiperazines from Australian marine-derived and terrestrial *Penicillium* spp. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 70, p. 1746-1752, 2007.

CHAKRAVARTI, R.; SAHAI, V. Optimization of compactin production in chemically defined production medium by *Penicillium citrinum* using statistical methods. **Process Biochemistry**, Barking, v. 38, p. 481-486, 2002.

CHEN, C.; SHAW, C.; CHEN, C.; TSAI, Y. 2,3,4-trimethyl-5,7-dihydroxy-2,3-dihydrobenzofuran, a novel antioxidant, from *Penicillium citrinum* F5. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 65, p. 740-741, 2002.

CIEGLER, A.; HAYES, A. W.; VESONDER, R. F. Production and biological activity of secalonic acid D. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 39, p. 285-287, 1980.

CLARK, B. R.; CAPON, R. J. LACEY, E.; TENNANT, S.; GILL, J. H. Citrinin revisited: from monomers to dimmers and beyond. **Organic Biomolecular Chemistry**, Cambridge, v. 4, p. 1520-1528, 2006.

COCKSHOTT, A.; R., SULLIVAN, G. R. Improving the fermentation medium for echinocandin B production. Part I: sequential statistical experimental design. **Process Biochemistry**, Barking, v. 36, p. 647-660, 2001.

COLWELL, R. R. Microbial diversity: the importance of exploration and conservation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Heidelberg, v. 18, p. 302-307, 1997.

CORREIA, J. J. Effects of antimetabolic agents on tubulin-nucleotide interactions. **Pharmacology & therapeutics**, Oxford, v. 52, p. 127-147, 1991.

CHRISTIAN, O. E.; COMPTON, J.; CHRISTIAN, K. R.; MOOBERRY, S. L.; VALERIOTE, F. A.; CREWS, P. Using jasplakinolide to turn on pathways that enable the isolation of new chaetoglobosins from *Phomopsis asparagi*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 68, p. 1592-1597, 2005.

CURRIE, J. N.; THOM, C. An oxalic acid producing *Penicillium*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 22, p. 287-293, 1915.

DILIP de SILVA, E.; GEIERMANN, A.; MITOVA, M. I.; KUEGLER, P.; BLUNT, J. W.; COLE, A. L. J.; MUNRO, M. H. G. Isolation of 2-pyridone alkaloids from a New Zealand marine-derived *Penicillium* species. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 72, p. 477-479, 2009.

DU, L.; YANG, X.; ZHU, T.; WANG, F. ; XIAO, X.; PARK, H.; GU, Q. Diketopiperazine alkaloids from a deep ocean sediment derived fungus *Penicillium* sp. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 57, p. 873-876, 2009.

DU, L.; Zhu, T.; Fang, Y.; Gu, Q.; Zhu, W. Unusual C₂₅ steroid isomers with bicyclo[4.4.1]A/B rings from a volcano ash-derived fungus *Penicillium citrinum*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 71, p. 1343-1351, 2008.

EHRlich, J.; BARTZ, Q. R.; SMITH, R. M.; JOSLYN, D. A.; BURKHOLDER, P. R. Chloromycetin, a new antibiotic from a soil actinomycete. **Science**, Washington, v. 106, p. 417-417, 1947.

EL-GENDY, M. M. A.; HAWAS, U. W.; JASPARS, M. Novel bioactive metabolites from a marine derived bacterium *Nocardia* sp. ALAA 2000 **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 61, p. 379–386, 2008.

ENDO, A. KURODA, M., TANZAWA, K. Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, Heidelberg, v. 72, p. 323-326, 1976.

FAULKNER, D. J. Marine natural products. **Natural Products Reports**, Cambridge, v. 14, p. 258-302, 1997.

HANSON, J. R. **Chemistry of fungi**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2008, p. 1-15.

HETHERINGTON, A. C.; RAISTRICK, H. On the production and chemical constitution of a new yellow colouring matter, citrinin, produced from glucose by *Penicillium citrinum* Thom. **Philosophical transactions of the Royal Society of London B**, London, v. 220, p. 269-295, 1931.

HIRANO, A; IWAI, Y.; MASUMA, R.; TEI, K.; OMURA, S. Neoxaline, a new alkaloid produced by *Aspergillus japonicus* production, isolation and properties. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 38, p. 781-785, 1979.

ITABASHI, T.; HOSOE, T.; WAKANA, D.; FUKUSHIMA, K.; TAKIZAWA, K.; YAGUCHI, T.; OKADA, K.; TAKASHI, G. M. C.; KAWAI, K. A new indoloditerpene derivative, penijanthing A, isolated from *Penicillium janthinellum*. **Journal of Natural Medicines**, Tokyo, v. 63, p. 96-99, 2009.

IWASAKI, S. Antimitotic agents: Chemistry and recognition of tubulin molecule. **Medicinal Research Reviews**, New York, v. 13, 183-198, 1993.

KAWAI, K.; NOZAWA, K.; NAKAJIMA, S.; IITAKA, Y. Studies of fungal products. VII The structures of meleagrins and 9-O-p-bromobenzoylmeleagrins. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 32, p. 94-98, 1984.

KAGATA, T.; SHIGEMORI, H.; MIKAMI, Y.; KOBAYASHI, J. Coruscol A, a new metabolite from the marine-derived fungus *Penicillium* species. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 63, p. 886-887, 2000.

KELECOM, A. Secondary metabolites from marine microorganisms. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 74, p. 151-170, 2002.

KIM, W. G.; SONG, N. K.; YOO, I. D.; Quinolactacins A1 and A2, new acetylcholinesterase inhibitors from *Penicillium citrinum*. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 54, p. 831-835, 2001.

KNIGHT, V.; SANGLIER, J.J.; DITULLIO, D.; BRACCILI, S.; BONNER, P.; WATERS, J.; HUGHES, D.; ZHANG, L. Diversifying microbial natural products for drug discovery. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 62, p. 446-458, 2003.

KOHLMEYER, J.; KOHLMEYER, E. **Marine mycology: the higher fungi**. New York: Academic Press, 1979.

KOIZUMI, Y.; MASAYOSHI, A.; TOMODA, H.; OMURA, S. Oxaline, a fungal alkaloid, arrests the cell cycle in M phase by inhibition of tubulin polymerization. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1963, p. 47-55, 2004.

KONDA, Y.; ONDA, M.; HIRANO, A.; OMURA, S. Oxaline and neoxaline. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 28, 2887-2993, 1980.

KOZLOVSKY, A. G.; ZHELIFONOVA, V. P.; ANTIPOVA, T. V.; ADANIN, V. M.; OZERSKAYA, S. M.; KOCHKINA, G. A. Quinocitrinines A and B, new quinoline alkaloids from *Penicillium citrinum* Thom 1910, a permafrost fungus. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 56, p. 488-491, 2003.

KUPKA, J.; ANKE, T.; STEGLICH, W.; ZECHLIN, L. Antibiotics from basidiomycetes. XI. The biological activity of sicayne, isolated from the marine fungus *Halocyphina villosa* J. & E. Kohlmeyer. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 34, p. 298-304, 1981.

KURAMATA, M.; FUJIOKA, S.; SHIMADA, A.; KAWANO, T.; KIMURA, Y. Citrinolactones A, B and C, and scleritin C, plant growth regulator from *Penicillium citrinum*. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, Tokyo, v. 71, p. 499-503, 2007.

KURAMOTO, M.; YAMADA, K.; SHIKANO, M.; YAZAWA, K.; ARIMOTO, H.; OKAMURA, T.; UEMURA, D. Tanzawaic acids A, B, C and D: Inhibitors of superoxide anion production from *Penicillium citrinum*. **Chemistry Letters**, Tokyo, v. 26, p. 885-886, 1997.

LI, X.; YAO, Y.; ZHENG, Y.; SATTTLER, I.; LIN, W. Cephalosporolides H and I, two novel lactones from a marine-derived fungus, *Penicillium* sp.. **Archives of Pharmacal Research**, Seoul, v. 30, p. 812-815, 2007.

LI, Y.; CUI, Z.; XU, Y.; ZHAO, H. Improvement of xylanase production by *Penicillium oxalicum* ZH-30 using response surface methodology. **Enzyme and Microbial Technology**, Guildford, v. 40, p. 1381-1388, 2007.

LIM, J. S.; PARK, M. C.; LEE, J. H.; PARK, S. W.; KIM, S. W. Optimization of culture medium and conditions for Neo-fructooligosaccharides production by *Penicillium citrinum*. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 221, p. 639-644, 2005.

LU, Z.; LIN, Z.; WANG, W.; DU, L.; ZHU, T.; FANG, Y.; GU, Q.; ZHU, W. Citrinin dimmers from the halotolerant fungus *Penicillium citrinum* B-57. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 71, p. 543-546, 2008.

MADIGAN, M.T.; MRATINKO, J.M.; PARKER, J. Microbial evolution, systematics and taxonomy. In: **Brock biology of microorganisms**. New Jersey: Prentice-Hall, 1997. 986 p.

MALMSTROM, J.; CHRISTOPHERSEN, C.; FRISVAD, J. C. Secondary metabolites characteristic of *Penicillium citrinum*, *Penicillium steckii* and related species. **Phytochemistry**, Oxford, v. 54, p. 301-309, 2000.

MOYA, P.; CANTIN, A.; CASTILLO, M. A.; PRIMO, J.; MIRANDA, M. A.; PRIMO-YÚFERA, E. Isolation, structural assignment, and synthesis of *N*-(2-methyl-3-oxodecanoyl)-2-pyrroline, a new natural product from *Penicillium brevicompactum* with *in vivo* anti-juvenile hormone activity. **The Journal of Organic Chemistry**, Easton, v. 63, p. 8530-8535, 1998.

NAGEL, D. W.; PACHLER, G. R.; STEYN, P. S.; WESSELS, P. L.; GAFNER, G.; KRUGER, G. J. X-ray structure of oxaline: a novel alkaloid from *Penicillium oxalicum*. **Journal of the Chemical Society Chemical communications**, London, v. 24, p. 1021-1022, 1974.

NIELSEN K. F.; SMEDSGAARD J. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography–UV–mass spectrometry methodology. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam v. 1002, p. 111–136, 2003.

NOZAWA, K; NAKAJIMA, S. Studies on fungal products 6. Isolation of radicicol from *Penicillium luteo aurantium*, and meleagrín, a new metabolite, from *Penicillium meleagrinum*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 42, p. 374-377, 1979.

NUMATA, A.; AMAGATA, T.; MINOURA, K.; ITO, T. Novel cytotoxic metabolites produced by a fungal strain from a sponge. **Tetrahedron Letters**, New York, v. 38, p. 5675-5678, 1997.

OOIJKAAS, L. P.; WILKINSON, E. C.; TRAMPER, J.; BUITELAAR, R. M. Medium optimization for spore production of *Coniothyrium minitans* using statistically-based experimental designs. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 64, p. 92-100, 1999.

PEI-CHIH, W.; HUEY-JEN, S.; CHIA-YIN, L. Characteristics of indoor and outdoor airborne fungi at suburban and urban homes in two seasons. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 253, p. 111-118, 2000.

POUPKO, R.; LUZ, Z.; DESTRO, R. Carbon-13 NMR of citrinin in the solid state and in solutions. **The Journal of Physical Chemistry A**, Washington, D.C., v. 101, 5097-5102, 1997.

PUPO, M. T.; GUIMARÃES, D. O.; FURTADO, A. J. C.; BORGES, W. S. Microbial natural products: A promising source of bioactive compounds. **Modern biotechnology in medicinal chemistry and industry**. Kerala: Research Signpost, 2006. p. 51-78.

RISPOLI, F. J.; SHAH, V. Mixture design as a first step for optimization of fermentation medium for cutinase production from *Colletotrichum lindemuthianum*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 34, p. 349-355, 2007.

SALEEM, M; ALI, M. S.; HUSSAIN, S.; JABBAR, A.; ASHRAF, M. LEE, Y.S. Marine natural products of fungal origin. **Natural Products Reports**, Cambridge, v. 24, p. 1142-1152, 2007.

SAYYAD, S.A.; PANDA, B.P.; JAVED, S.; ALI, M. Optimization of nutrient parameters for lovastatin production by *Monascus purpureus* MTCC 369 under submerged fermentation using response surface methodology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 73, p. 1054-1058, 2007.

SHI, L.E.; YING, G.Q.; ZHANG, X.Y.; TANG, Z.X.; CHEN, J.S.; XIONG, W.Y.; LIU, H.Z. Medium optimization for 5'-Phosphodiesterase production from *Penicillium citrinum* using response surface methodology. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 45, p. 126-133, 2007.

SINGH, G. S. β -lactams in the new millennium. Part-I: Monobactams and carbapenems. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, Hilversum, v. 4, p. 69-92, 2004.

SINGH, G. S. β -lactams in the new millennium. Part-II: Cephems, oxacephems, penams and sulbactam. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, Hilversum, v. 4, p. 93-109. 2004.

SMETANINA, O. F.; KALINOVSKY, A. I.; KHUDYAKOVA, Y. V.; PIVKIN, M. V.; DMITRENOK, P. S.; FEDOROV, S. N.; JI, H.; KWAK, J.; KUSNETSOVA, T. A. Indole alkaloids produced by a marine fungus isolated of *Penicillium janthinellum* Biourge. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 70, p. 906-909, 2007.

STEYN, P. S. The isolation, structure and absolute configuration of secalonic acid D, the toxic metabolite of *Penicillium oxalicum*. **Tetrahedron**, Oxford, v. 26, p. 51-57, 1970.

SWINGLE, K. F.; MOORE, G.G. I. Preclinical pharmacological studies with nimesulide. **Drugs Under Experimental and Clinical Research**, Barcelona, v. 10, p. 587-597, 1984.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, p. 338-350, 2006.

TSUDA, M.; KASAI, Y.; KOMATSU, K.; SONE, T.; TANAKA, M.; MIKAMI, Y.; KOBAYASHI, J. Citrinadin A, a novel pentacyclic alkaloid from marine-derived fungus *Penicillium citrinum*. **Organic Letters**, Washington, v. 6, p. 3087-3089, 2004.

TSUDA, M.; SASAKI, M.; MUGISHIMA, T.; KOMATSU, K.; SONE, T.; TANAKA, M.; MIKAMI, Y.; KOBAYASHI, J. Scalusamides A-C, New pyrrolidine alkaloids from the marine-derived fungus *Penicillium citrinum*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 68, p. 273-276, 2005.

VAROGLU, M.; CREWS, P. Biosynthetically diverse compounds from a saltwater culture of sponge-derived *Aspergillus niger*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 63, p. 41-43, 2000.

VITA-MARQUES, Aline Maria. **Isolamento, atividade biológica e análise do perfil químico de fungos coletados no litoral do Estado de São Paulo**. 2003. 179 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

VITA-MARQUES, A. M.; LIRA, S. P.; BERLINCK, R. G. S.; SELEGHIM, M. H. R.; SPONCHIADO, S. R. P.; BARATA, M.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; CAVALCANTI, B. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; SOUZA, A. O.; GALETTI, F. C. S.; SILVA, C. L.; SILVA, M.; PIMENTA, E. F.; THIEMANN, O.; PASSARINI, M. R. Z.; SETTE, L. D. A multi-screening approach for marine-derived fungal metabolites and the isolation of cyclodepsipeptides from *Beauveria felina* **Química Nova**, São Paulo, v. 31, p. 1099-1103, 2008.

WAKAMA, D.; HOSOE, T.; ITABASHI, T.; OKADA, K.; TAKAKI, G. M. C.; YAGUCHI, T.; FUKUSHIMA, K.; KAWAI, K. New citrinin derivatives isolated from *Penicillium citrinum*. **Journal of Natural Medicines**, Tokyo, v. 60, p. 279-284, 2009.

ZHELIFONOVA, V. P.; ANTIPOVA, T. V.; OZERSKAYA, S. M.; KOCHKINA, G. A.; KOSLOVSKY, A. G. Secondary metabolites of *Penicillium* fungi isolated from permafrost deposits as chemotaxonomic markers. **Microbiology**, Washington, v. 78, p. 350-354, 2009.